

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

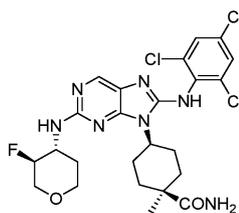
(11) **039392**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>A61K 31/52</i> (2006.01) |
| 2022.01.21 | | <i>A61K 31/505</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки | | <i>A61K 31/519</i> (2006.01) |
| 201892229 | | <i>C07D 473/02</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки | | <i>C07D 473/26</i> (2006.01) |
| 2017.03.31 | | <i>C07D 473/32</i> (2006.01) |

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЗАМЕЩЕННОГО АМИНОПУРИНОВОГО СОЕДИНЕНИЯ

- | | |
|---|--|
| (31) 62/317,412 | Миколон Дэвид, Рэймон Хитер, Ши Тао, Тран Там М., Цудзи Тосия, Вон Лилли Л., Сюй Суйчань, Чжу Дань (US) |
| (32) 2016.04.01 | |
| (33) US | |
| (43) 2019.03.29 | |
| (86) PCT/US2017/025252 | |
| (87) WO 2017/173206 2017.10.05 | (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИГНАЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ЭлЭлСи (US) | (56) US-A1-20100016586
US-A1-20070142405
US-A1-20130225564
US-A1-20160096841 |
| (72) Изобретатель:
Бойлан Джон Ф., Брэй Гордон Л., Филварофф Эллен, Хаббард Роберт, | |

- (57) Изобретение относится к способу лечения рака, включающий введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9H-пурин-9-ил)-1-метилциклогексанкарбоксамид, имеющего следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемую соль или таутомер, где рак представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, почечно-клеточную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, гепатоклеточную карциному, рак печени, рак легких, рак поджелудочной железы, лейкоз или множественную миелому. Способ лечения может быть осуществлен путем введения фармацевтической композиции, содержащей (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9H-пурин-9-ил)-1-метилциклогексанкарбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль или таутомер и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

B1**039392****039392****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США № 62/317,412, поданной 1 апреля 2016 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

Область техники

В настоящем документе предложены способы лечения или предупреждения рака, включая солидные опухоли и гематологические онкологические заболевания, включающие введение эффективного количества определенных аминопуриновых соединений, описанных в настоящем документе, и композиции, содержащие эффективное количество таких соединений.

Уровень техники

Раковые заболевания характеризуются главным образом повышением количества атипичных клеток, образованных из определенной нормальной ткани, инвазией этих атипичных клеток в соседние ткани или распространением злокачественных клеток, переносимых с лимфой или кровью, в регионарные лимфатические узлы и отдаленные локализации (метастазы). Клинические данные и молекулярно-биологические исследования указывают на то, что рак является многостадийным процессом, начинающимся с небольших преднеопластических изменений, которые при определенных условиях могут прогрессировать в новообразование. Очаг новообразования может развиваться клонально и вырабатывать возрастающую способность к инвазии, росту, метастазированию и гетерогенности, особенно в условиях, при которых клетки новообразования ускользают от иммунного надзора хозяина (Roitt, I., Brostoff, J and Kale, D., Immunology, 17.1-17.12 (3rd ed., Mosby, St. Louis, Mo., 1993)).

Раковые заболевания являются одной из ведущих причин смерти во всем мире, составляя 8,2 миллиона в 2012 г. Ожидается, что ежегодное число случаев заболевания раком в течение следующих двух десятилетий возрастет с 14 миллионов в 2012 г. до 22 миллионов (см. Основные факты о раке, № 297, Всемирная Организация Здравоохранения, февраль 2014 г., найдено 10 июня 2014 г., и Globocan 2012, IARC).

Лекарственные средства, в настоящее время используемые для лечения рака, являются высоко токсичными и неспецифичными. Применяемые в настоящее время принципы противораковой терапии обычно направлены на быстро пролиферирующие клетки, что позволяет уменьшить первичные и метастатические опухоли, но такие эффекты обычно являются временными, и в случае наиболее метастатических видов рака часто случаются рецидивы опухолей. Одной из возможных причин неэффективности является наличие раковых стволовых клеток. В отличие от большинства клеток опухоли раковые стволовые клетки устойчивы к хорошо определенной химиотерапии и после проведения лечения способны регенерировать все типы клеток опухоли посредством поведения, подобного стволовым клеткам, имеющего в значительной степени скрытую природу, и высокой экспрессии транспортеров лекарственных средств.

В медицинской литературе подробно описано огромное количество видов рака. Заболеваемость раком продолжает возрастать одновременно со старением популяции, развитием новых видов рака и роста предрасположенных популяций (в их числе люди, больные СПИДом или избыточно подверженные воздействию солнечного света). Однако варианты лечения рака ограничены. Таким образом, существует огромная потребность в новых способах и композициях, которые могут быть использованы для лечения пациентов, больных раком.

Цитирование или указание любого источника в разделе настоящей заявки не должно рассматриваться как признание того, что указанный источник представляет собой документ уровня техники по отношению к настоящей заявке.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе предложены аминопуриновые соединения, включая композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие такие аминопуриновые соединения, которые могут быть использованы в способах, предложенных в настоящем документе.

В настоящем документе предложены способы лечения рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания. Аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использовано в способах лечения или предупреждения рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, как описано в настоящем документе. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения 1. В настоящем документе также предложены способы лечения и предупреждения метастазирования рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе. Аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использовано в способах лечения и предупреждения метастазирования рака. Кроме того, в настоящем документе предложены способы устранения раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе. Аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использовано в способах устранения раковых стволовых клеток у субъекта. Также предложены способы индукции дифференцировки ра-

ковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе. Аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использовано в способах индукции дифференцировки раковых стволовых клеток у субъекта. В еще одном аспекте предложены способы индукции гибели раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе. Аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использовано в способах индукции гибели раковых стволовых клеток у субъекта.

В настоящем документе предложены способы лечения рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, с помощью фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, описанное в настоящем документе. Фармацевтическая композиция, содержащая аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использована в способах лечения или предупреждения рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, как описано в настоящем документе. Способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе. Фармацевтическая композиция, содержащая аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использована в способах лечения и предупреждения метастазирования рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе предложены способы устранения раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе. Фармацевтическая композиция, содержащая аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использована в способах устранения раковых стволовых клеток у субъекта. Также предложены способы индукции дифференцировки раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе. Фармацевтическая композиция, содержащая аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использована в способах индукции дифференцировки раковых стволовых клеток у субъекта. В еще одном аспекте предложены способы индукции гибели раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, включающей аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе. Фармацевтическая композиция, содержащая аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, может быть использована в способах индукции гибели раковых стволовых клеток у субъекта.

Соединения, пригодные для применения в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой аминопуриновые соединения, как описано в настоящем документе, такие как, например, представленные в табл. 1, или их фармацевтически приемлемую соль, таутомер, стереоизомер, энантиомер или его изотополог, и фармацевтические композиции, содержащие аминопуриновые соединения.

Настоящие варианты осуществления могут быть более ясны со ссылкой на подробное описание изобретения и примеры, предназначенные для иллюстрации неограничивающих вариантов осуществления.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано, что обработка соединением 1 вызывает устойчивое ингибирование субстрата ERK pRSK1 S380 в клетках Colo 205 (мутация BRAFV600E). Клетки Colo 205 обрабатывали ДМСО или 0,5 мкМ соединения 1 в течение указанного времени. pRSK1 S380 измеряли с помощью анализа на основе MSD (вверху). DUSP4 и DUSP6 определяли с помощью вестерн-блоттинга (внизу).

На фиг. 2A-2I показано, что соединение 1 эффективно ингибирует передачу сигналов MAP-киназой и нижерасположенными генами-мишенями в Colo 205. Культуры линии клеток рака толстой кишки Colo 205 (BRAF V600E) обрабатывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 2, 8 или 24 ч. На фиг. 2A показаны белки, выделенные из обработанных клеток и проанализированные с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против DUSP4, DUSP6, циклина D1, c-Мус, YAP или β-актина. На фиг. 2B-2C показаны РНК, выделенные с помощью набора Cell-To-CT, количественную ПЦР проводили с помощью зондов, специфичных для DUSP4, DUSP6, SPRY2, c-Мус и циклина D1. Для нормализации использовали специфичные зонды для β-актина. На фиг. 2D-2I показано, что обработка Соединением 1 модулирует уровни мРНК, управляемые MAPK, в клетках Colo 205 (мутация BRAFV600E) и HT-29 (мутация BRAFV600E). Клетки Colo 205 или HT-29 обрабатывали ДМСО или 0,3 или 1 мкМ Соединения 1 в течение 6 ч. мРНК выделяли с помощью набора MagMAX Total RNA Isolation kit и проводили количественную ПЦР.

На фиг. 3A показаны действия соединения 1 на гены-мишени сигнального пути WNT/бета-катенина и HIPPO/YAP в Colo 205. Культуры линии клеток рака толстой кишки Colo 205 (BRAF V600E) обраба-

тывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 2, 8 или 24 ч. РНК выделяли с помощью набора Cell-To-CT и проводили количественную ПЦР с помощью зондов, специфичных для актина 2, CTGF и AREG. Для нормализации использовали специфичные зонды для β -актина. На фиг. 3В-3Е показано, что обработка Соединением 1 регулирует уровни мРНК, управляемые YAP, в клетках Colo 205 (мутация BRAFV600E) и HT-29 (мутация BRAFV600E). Клетки Colo 205 или HT-29 обрабатывали ДМСО или 0,3 или 1 мкМ соединения 1 в течение 6 ч. РНК выделяли с помощью набора MagMAX Total RNA Isolation kit и проводили количественную ПЦР.

На фиг. 4А-4В показано, что соединение 1 понижает уровень PD-L1 в нескольких линиях раковых клеток. На фиг. 4А показан вестерн-блоттинг общего PD-L1 в Норбб, Karpas-299 и LOX-IMVT. Клетки культивировали в присутствии или в отсутствие соединения 1 в течение указанного времени перед измерением уровней экспрессии PD-L1, DUSP4 и α -тубулина или α -актина с помощью вестерн-блоттинга. На фиг. 4В показано окрашивание PD-L1 на поверхности с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Клетки обрабатывали ДМСО или соединением 1 в указанных концентрациях в течение 48 ч и детектировали экспрессию PD-L1 на клеточной поверхности с помощью анализа FACS с APC (аллофикоцианин)-меченым антителом к PD-L1 (клон 29E.1A3.; BioLegend, Сан-Диего, Калифорния).

Геометрическое среднее для PD-L1-положительных клеток определяли с помощью FlowJo 10 (TreeStar, Ашленд, Орегон).

На фиг. 5А-5В показано, что в клетках KARPAS-299, обработанных соединением 1, увеличена продукция ИЛ-2 (фиг. 5А) и ИФН γ (фиг. 5В) Т-клетками, полученными из МНПК, стимулированными суперантигеном (SEB) *in vitro*. Клетки KARPAS-299 обрабатывали ДМСО (D) или соединением 1 в указанных концентрациях в течение 48 ч. МНПК от здоровых доноров обрабатывали или не обрабатывали 20 нг/мл SEB в течение 48 ч. МНПК после промывки PBS инкубировали с раковыми клетками в течение 24 ч и собирали супернатанты для измерения ИЛ-2 и ИФН γ с помощью анализов на основе MSD. На фиг. 5С показано действие обработки соединением 1 на уровни ИЛ-8, определенные в культуральных средах МНПК. МНПК выделяли из цельной крови и культивировали в среде RPMI с 10% FBS. МНПК высевали в количестве 1×10^6 на миллилитр на чашки величиной 10 см². МНПК обрабатывали 0,1% ДМСО или 0,5 мкМ соединения 1. Результаты обработки регистрировали в установленные моменты времени. МНПК осаждали центрифугированием и использовали для вестерн-блоттинга, и 1 мл культуральной среды отбирали для анализа на ИЛ-8. Анализ на ИЛ-8 проводили с помощью набора Mesoscale V-Plex Human IL-8 в соответствии с инструкциями производителя. Было показано, что соединение 1 ингибирует уровни ИЛ-8 в различные моменты времени.

На фиг. 6 показана противоопухолевая активность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели LOX-IMVI. Самкам мышей ТКИД прививали 1×10^6 опухолевых клеток LOX-IMVI в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=9/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 13 день, когда опухоли составляли примерно 240 мм³.

На фиг. 7 показана противоопухолевая активность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели LOX IMVI. Самкам мышей ТКИД (с тяжелым комбинированным иммунодефицитом) прививали 1×10^6 опухолевых клеток LOX-IMVI в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 13 день, когда опухоли составляли приблизительно 300 мм³. Процент ингибирования рассчитывается относительно контроля носителем в последний день исследования и приведен в скобках рядом с соответствующим объемом опухоли для групп лечения. Пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз.

На фиг. 8 показана противоопухолевая активность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели Colo 205. Самкам мышей ТКИД прививали 2×10^6 опухолевых клеток Colo 205 в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 10 день, когда опухоли составляли приблизительно 160 мм³. Процент ингибирования рассчитывается относительно контроля носителем в последний день исследования и приведен в скобках рядом с соответствующим объемом опухоли для групп лечения. Пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз.

На фиг. 9 показана противоопухолевая активность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели Colo 205. Самкам мышей ТКИД прививали 2×10^6 опухолевых клеток Colo 205 в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 10 день, когда опухоли составляли приблизительно 130 или 160 мм³. Процент ингибирования рассчитывается относительно контроля носителем в последний день исследования и приведен в круглых скобках рядом с соответствующим объемом опухоли для групп лечения. Пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз.

На фиг. 10А-10В показана противоопухолевая активность Соединения 1 в ксенотрансплантатной модели PDX146. Самкам мышей NSG прививали 25 мкг опухоли PDX146 в суспензии клеток в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли на в группы лечения (n=8-10/группа).

Лечение исследуемым соединением начинали на 19 день, когда опухоли составляли приблизительно 100-110 мм³. На фиг. 10А показана зависимость объема опухоли от времени. На фиг. 10В показаны отдельно взятые объемы опухолей в последний день исследования, день 40. Процент ингибирования рассчитывается относительно контроля носителем в последний день исследования и приведен в круглых скобках рядом с соответствующим объемом опухоли для групп лечения. Пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз. Сатр=кампитосар.

На фиг. 11 показано замедление роста опухоли при непрерывном лечении Соединением 1 в ксенотрансплантатной модели PDX146. Самкам мышей NSG прививали 25 мкг опухоли PDX146 в суспензии клеток в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=8-10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 16 день, когда опухоли составляли приблизительно 100-110 мм³. Черная пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз, а красная пунктирная линия обозначает объем опухоли на 43 день, когда обработку группы контроля носителем прекращали.

На фиг. 12А-12D показаны разовые дозы Соединения 1, ингибирующие биомаркеры в сигнальных путях MAPK, Wnt и Hippo в ксенотрансплантатной модели PDX146: модуляция сигнальных путей MAPK, Wnt и Hippo в опухолях PDX146, обработанных Соединением 1. Анализы количественной ПЦР в реальном времени проводили на РНК, выделенной из опухолей PDX146 в указанный момент времени после введения доз. Данные выражали как среднее \pm SEM (стандартная ошибка среднего). Значения Р получали из одностороннего ANOVA с последующим тестом Дюннета.

На фиг. 13А-13D показано ингибирование Соединением 1 биомаркеров в сигнальных путях MAPK, Wnt и Hippo из опухолей PDX146 после введения разовой дозы: модуляция сигнальных путей MAPK, Wnt и Hippo в опухолях PDX146, обработанных Соединением 1. Анализы количественной ПЦР в реальном времени проводили на РНК, выделенной из опухолей PDX146 в указанный момент времени после введения доз. Данные YAP получали из анализа с помощью вестерн-блоттинга опухолей из группы лечения 5 мг/кг и выражали как отношение экспрессии белка YAP к экспрессии белка β -актина. Данные выражали как среднее \pm SEM. Значения Р получали из одностороннего ANOVA с последующим тестом Дюннета.

На фиг. 14А-14D показано, что уровни белков фосфо-RSK (pRSK) и фосфо-ERK (pERK), биомаркеров сигнального пути MAPK, модулируются введением разовой дозы Соединения 1. Проводили вестерн-блоттинг (pRSK) или анализ на основе Mesoscale (pERK) белка, выделенного из опухолей PDX146 в указанный момент времени после введения доз. Данные по фосфо-RSK выражены в % от контроля носителем. Данные по фосфо-ERK выражены как среднее \pm SEM.

На фиг. 15А-15В показана противоопухолевая активность Соединения 1 в ксенотрансплантатной модели β -катенин-мутантного колоректального рака SW48. Самкам мышей ТКИД прививали 2×10^6 опухолевых клеток SW48 в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 10 день, когда опухоли составляли приблизительно 110 и 105 мм³ (фиг. 15А и Фиг. 15В, соответственно). Черная пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз. График слева представляет собой исследование зависимости "доза-ответ" (график А). На фиг. 15В показано исследование времени до прогрессирования заболевания, в ходе которого животные постоянно получали лекарственное средство (график В). Пунктирная линия обозначает объем опухоли на 28 день, когда лечение группы контроля носителем прекращали.

На фиг. 16. показана противоопухолевая активность в ортотопическом ксенотрансплантате гепатоклеточной карциномы Нер3В2.1-7. Самкам мышей ТКИД ортотопически прививали 2×10^6 опухолевых клеток Нер3В2.1-7 на животное. Через семь дней после прививки животных случайным образом распределяли в группы лечения по массе тела и начинали лечение (0 день исследования). Оценка степени приживаемости в сателлитной группе подтвердила наличие опухоли печени у 100% животных. Дозы Соединения 1 вводили перорально, р/сут в течение 21 дня. В день прекращения исследования опухоли удаляли и взвешивали. На график нанесены массы отдельно взятых опухолей и средняя масса опухоли \pm SEM для каждой группы. Процент ингибирования рассчитан относительно контроля носителем и приведено выше соответствующих масс опухолей для групп лечения. Значения Р получали из одностороннего ANOVA с последующим тестом Дюннета. ***=p<0,001. Соединение 1 показало статистически значимое снижение массы опухоли по сравнению с контролями носителем.

На фиг. 17. показана противоопухолевая активность соединения 1 в полученной от пациента ксенотрансплантатной модели гепатоклеточной карциномы LI0612 с амплификацией C-Met. Самкам мышей ТКИД прививали фрагменты опухолей PDX (полученной от пациента) модели гепатоклеточной карциномы LI0612 (диаметром 2-4 мм) в правый бок. В начале лечения мышей случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 18 день, когда опухоли составляли приблизительно 150 мм³. Рост опухоли прогрессировал в группах контроля носителем и лечения соединением 1 за период введения доз. Изменение кинетики роста отмечалось при введении соединения 1, что приводило к значительному ингибированию роста опухоли (TGI) при введении 30

мг/кг ($p=0,038$ по сравнению с контролем носителем).

На фиг. 18 показана чувствительность линий клеток, имеющих мутацию β -катенина, к обработке соединением 1, и показано, что линии клеток, имеющие мутацию β -катенина, как правило, более чувствительны к обработке соединением 1.

На фиг. 19А-19Е показана чувствительность линий клеток и устойчивость к обработке соединением 1. На фиг. 19А-19С показано, что линии клеток, содержащие мутации BRAF и CTNNB1, более чувствительны к обработке соединением 1, чем линии клеток с BRAF и CTNNB1 дикого типа. На фиг. 19D и фиг. 19Е показано, что линии клеток с мутациями в сигнальном пути RB и PI3K/PTEN связаны с устойчивостью к обработке соединением 1 *in vitro*.

На фиг. 20 показано, что соединение 1 модулирует MAPK, P- катенин и YAP в BRAF- и CTNNB1-мутантной линии клеток SW48.

На фиг. 21А-21В показано, что соединение 1 модулирует экспрессию гена-мишени, контролируруемую MAPK, β -катенином и YAP в BRAF- и CTNNB1-мутантной линии клеток SW48.

На фиг. 22 показано, что соединение 1 ингибирует экспрессию актина 2 в клетках бронхиального эпителия человека. Экспрессию гена измеряли через 24 ч.

На фиг. 23А-23D показано, что соединение 1 ингибирует образование колоний β -катенин-мутантных клеток на уровне, превышающем ингибиторы MEK (траметиниб) и ингибиторы ERK (GDC0994). На фиг. 23А показано ингибирование образования колоний клеток SW48 (рак толстой кишки). На фиг. 23В показано ингибирование образования колоний клеток HCT-116 (рак толстой кишки). На фиг. 23С показано ингибирование образования колоний клеток AGS (рак желудка). На фиг. 23D показано ингибирование образования колоний клеток Hep3B (ГМК).

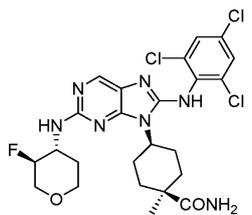
На фиг. 24 показано, что клетки AGS, устойчивые к ингибитору MEK траметинибу, чувствительны к соединению 1 в анализе образования колоний.

На фиг. 25 показана активность репортера TEAD в клетках WI38 VA13 SxGTPC-люциферазы, обработанных соединением 1 и траметинибом в течение 72 ч. Активность люциферазы анализировали с помощью анализа Bright Glo luciferase (Promega). Соединение 1 ингибирует активность репортера TEAD со средней IC_{50} более 10 мкМ в 24-часовом анализе и средней IC_{50} , равной 1,85 мкМ, в 72-часовом анализе (сводные данные трех экспериментов). Соединение 1 не воздействовало воспроизводимым образом на жизнеспособность в трех анализах. Траметиниб не ингибировал активность репортера TEAD через 24 или 72 ч.

Подробное описание изобретения

Определения

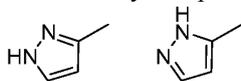
"Соединение 1" относится к соединению (включая его фармацевтически приемлемые соли, таутомеры, имеющему название: цис-4-[2-{{(3S,4R)-3-фтороксан-4-ил}амино}-8-(2,4,6-трихлоранилино)-9H-пурин-9-ил]-1-метилциклогексан-1-карбоксамид и имеющему альтернативное название: (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9H-пурин-9-ил)-1-метилциклогексанкарбоксамид; и как указано ниже:



В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемая(ые) соль(ли)" относится к соли, полученной из фармацевтически приемлемой нетоксичной кислоты или основания, включая неорганическую кислоту и основание и органическую кислоту и основание. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований соединений формулы (I) включают, но не ограничены перечисленным, соли металлов, полученные с алюминием, кальцием, литием, магнием, калием, натрием и цинком, или органические соли, полученных с лизином, N,N'-дибензилэтилендиамином, хлорпрокаином, холином, диэтаноломином, этилендиамином, меглюмином (N-метилглюкамином) и прокаином. Подходящие нетоксичные кислоты включают, но не ограничены перечисленным, неорганические и органические кислоты, такие как уксусная, альгиновая, антрациловая, бензолсульфоновая, бензойная, камфорсульфоновая, лимонная, этенсульфоновая, муравьиная, фумаровая, фуранкарбонная, галактуроновая, глюконовая, глюкуроновая, глутаминовая, гликолевая, бромисто-водородная, соляная, изотионовая, молочная, малеиновая, яблочная, миндальная, метансульфоновая, муциновая, азотная, памоевая, пантотеновая, фенилуксусная, фосфорная, пропионовая, салициловая, стеариновая, янтарная, сульфаниловая, серная, винная кислота и п-толуолсульфоновая кислота. Конкретные нетоксичные кислоты включают соляную, бромисто-водородную, малеиновую, фосфорную, серную и метансульфоновую кислоты. Примеры конкретных солей, таким образом, включают гидрохлоридные и мезилатные соли. Другие соли хорошо известны в данной области техники, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds.,

Mack Publishing, Easton PA (1990) или Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995).

"Таутомеры" относятся к изомерным формам соединения, которые находятся в равновесии друг с другом. Концентрации изомерных форм будут зависеть от среды, в которой находится соединение, и могут быть различными в зависимости, например, от того, является ли соединение твердым или находится в органическом растворителе или водном растворе. Например, в водном растворе пиразолы могут иметь следующие изомерные формы, являющиеся таутомерами друг друга:



Как ясно специалисту в данной области техники, большое количество функциональных групп и других структур может проявлять таутомерию, и все таутомеры соединений формулы (I) входят в объем настоящего изобретения.

Следует также отметить, что аминопуриновые соединения могут содержать неестественные соотношения атомных изотопов для одного или нескольких атомов. Например, соединения могут быть радиоактивно мечены радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий (³H), иод-125 (¹²⁵I), сера-35 (³⁵S) или углерод-14 (¹⁴C), или могут быть изотопно обогащены, например, дейтерием (²H), углеродом-13 (¹³C) или азотом-15 (¹⁵N). В контексте настоящего документа термин "изотополог" представляет собой изотопно-обогащенное соединение. Термин "изотопно-обогащенный" относится к атому, имеющему изотопный состав, отличный от естественного изотопного состава этого атома. "Изотопно-обогащенный" также может относиться к соединению, содержащему по меньшей мере один атом, имеющий изотопный состав, отличный от природного изотопного состава этого атома. Термин "изотопный состав" относится к количеству каждого изотопа, присутствующего для данного атома. Меченые радиоактивными изотопами и изотопно-обогащенные соединения пригодны в качестве терапевтических агентов, например, терапевтических агентов для лечения рака и воспаления, реагентов для исследований, например, реагентов для анализа связывания, и диагностических агентов, например, *in vivo* визуализирующих агентов. Подразумевается, что все изотопные варианты аминопуриновых соединений, описанных в настоящем документе, независимо от того, являются ли они радиоактивными или нет, входят в объем вариантов осуществления, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложены изотопологи аминопуриновых соединений, например, представляющие собой аминопуриновые соединения, обогащенные дейтерием, углеродом-13 или азотом-15.

В контексте настоящего документа "лечение" означает облегчение, полностью или частично, расстройства, заболевания или состояния, или одного или более симптомов, связанных с расстройством, заболеванием или состоянием, или замедление или остановку дальнейшего прогрессирования или ухудшения этих симптомов, или облегчение или устранение самой (самих) причины (причин) расстройства, заболевания или состояния. В одном из вариантов осуществления расстройство представляет собой рак, в частности, солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления "лечение" означает облегчение, полностью или частично, рака или симптомов, связанных с раком, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, или замедление или остановку дальнейшего прогрессирования или ухудшения этих симптомов.

В контексте настоящего документа "предупреждение" означает способ задержки и/или предотвращения начала, рецидива или распространения, полностью или частично, рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания; препятствие развитию рака у субъекта, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания; или снижения риска развития рака у субъекта, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания.

Термин "эффективное количество" по отношению к аминопуриновому соединению означает количество, способное лечить или предупреждать рак, в частности, солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, или их симптомы, как раскрыто в настоящем документе. Эффективное количество аминопуринового соединения, например, в фармацевтической композиции, может находиться на уровне, который будет оказывать желаемое действие; например, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 100 мг/кг массы тела пациента в единичной дозе для парентерального введения. Как будет ясно специалистам в данной области техники, следует ожидать, что эффективное количество аминопуринового соединения, раскрытого в настоящем документе, может различаться в зависимости от степени тяжести состояния, подлежащего лечению.

В контексте настоящего документа термины "пациент" и "субъект" включают животное, включая, но не ограничиваясь перечисленным, такое животное, как корова, обезьяна, лошадь, овца, свинья, курица, индейка, перепел, кошка, собака, мышь, крыса, кролик или морская свинка, в одном из вариантов осуществления - млекопитающее, в другом варианте осуществления - человека. В одном из вариантов осуществления субъект представляет собой человека, страдающего от или подверженного риску развития рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, или его

симптомов. В одном из вариантов осуществления пациент представляет собой человека, имеющего гистологически или цитологически подтвержденную солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, включая субъектов, которые прогрессировали (или не смогли переносить) на фоне стандартной противораковой терапии, или для которых не существует стандартной противораковой терапии.

В контексте настоящего документа и если не указано иное, термин "рак" относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, обычно характеризующееся неконтролируемым ростом клеток. Примеры рака включают солидные опухоли и гематологические онкологические заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой первичный рак, в других рак является метастазировавшим.

В контексте настоящего документа "солидные опухоли" включают, но не ограничены перечисленным, рак мочевого пузыря (включая, но не ограничиваясь перечисленным, поверхностный рак мочевого пузыря), рак молочной железы (включая, но не ограничиваясь перечисленным, люминальный тип В, ER+, PR+ и Her2+ рак молочной железы), рак центральной нервной системы (включая, но не ограничиваясь перечисленным, мультиформную глиобластому (GBM), глиому, медуллобластому и астроцитому), колоректальный рак, рак желудочно-кишечного тракта (включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак желудка, рак пищевода и рак прямой кишки), эндокринный рак (включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак щитовидной железы и рак надпочечников), рак глаза (включая, но не ограничиваясь перечисленным, ретинобластому), рак женской мочеполовой системы (включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак плаценты, матки, вульвы, яичника, шейки матки), рак головы и шеи (включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак глотки, пищевода и языка), рак печени, рак легкого (включая, но не ограничиваясь перечисленным, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), мукоэпидермоидную, бронхогенную, плоскоклеточную карциному (SQCC) и анапластический рак/НМРЛ), рак кожи (включая, но не ограничиваясь перечисленным, меланому и SQCC), рак мягких тканей (включая, но не ограничиваясь перечисленным, саркому, саркому Юинга и рабдомиосаркому), рак кости (включая, но не ограничиваясь перечисленным, саркому, саркому Юинга и остеосаркому), плоскоклеточный рак (включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак легкого, пищевода, шейки матки и головы и шеи), рак поджелудочной железы, рак почки (включая, но не ограничиваясь перечисленным, почечную опухоль Вильмса и почечно-клеточную карциному) и рак предстательной железы. В одном из вариантов осуществления солидная опухоль не представляет собой тройной негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легкого или рак мочевого пузыря. В одном из таких вариантов осуществления солидная опухоль представляет собой поверхностный рак мочевого пузыря. В другом случае солидная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному легкого. В еще одном варианте осуществления солидная опухоль представляет собой рак молочной железы люминального типа В.

В контексте настоящего документа "гематологическое онкологическое заболевание" включает, но не ограничено перечисленным, лейкоз (включая, но не ограничиваясь перечисленным, острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острый Т-клеточный лейкоз, лейкоз из предшественников В-клеток, острый промиелоцитарный лейкоз (APML), плазмоклеточный лейкоз, миеломонобластный/Т-ОЛЛ (Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз), В миеломоноцитарный лейкоз, эритролейкоз и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)), лимфому (включая, но не ограничиваясь перечисленным, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (НХЛ), лимфому Беркитта (ЛБ), В-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, фолликулярную лимфому (ФЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), крупноклеточную иммунобластную лимфому) и множественную миелому.

В случае ракового заболевания ингибирование может быть оценено по ингибированию прогрессирования заболевания, ингибированию роста опухоли, уменьшению первичной опухоли, облегчению симптомов, связанных с опухолью, ингибированию секретируемых опухолью факторов (включая секретируемые опухолью гормоны, такие как способствующие карциноидному синдрому), замедленному появлению первичных или вторичных опухолей, замедлению развития первичных или вторичных опухолей, снижению частоты первичных или вторичных опухолей, замедлению или снижению тяжести вторичных действий заболевания, остановке роста опухоли и регрессии опухолей, увеличению времени до прогрессирования (ВДП), увеличению выживаемости без прогрессирования (ВБ), увеличению общей выживаемости (ОВ) и другим. ОВ в контексте настоящего документа означает время от начала лечения до смерти по любой причине. ВДП в контексте настоящего документа означает время от начала лечения до прогрессирования опухоли; ВДП не включает случаи летального исхода. В контексте настоящего документа ВБ означает время от начала лечения до прогрессирования опухоли или смерти. В одном из вариантов осуществления уровни ВБ вычисляются с помощью оценки Каплана-Мейера. Крайний случай полного ингибирования в настоящем документе называется предупреждением или хемопревенцией. В этом контексте термин "предупреждение" включает либо предупреждение возникновения клинически выраженного рака в целом, либо предупреждение возникновения выраженной доклинической стадии рака. Также подразумевается, что это определение включает предупреждение превращения в злокачест-

венные клетки или остановка или обращение прогрессирования предзлокачественных клеток в злокачественные клетки. Это включает профилактическое лечение пациентов с риском развития рака.

В некоторых вариантах лечение лимфомы может быть оценено с помощью Международных экспертных критериев (IWC) для неходжкинской лимфомы (НХЛ) (см. Cheson BD, Pfistner B, Juweid, ME, et. al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. J. Clin. Oncol: 2007: (25) 579-586), используя определения ответа и конечных точек, приведенные ниже:

Ответ	Определение	Узловые массы	Селезенка, печень	Костный мозг
ПР	Исчезновение всех проявлений заболевания	(а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; допускается масса любого размера в случае отрицательной ПЭТ (b) вариабельно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; регрессия до нормального размера на КТ	Не прощупывается, узелки исчезли	Инфильтрат не обнаружен на повторной биопсии; если неопределимо посредством морфологического анализа, иммуногистохимия должна быть отрицательной
ЧР	Регрессия измеримых проявлений заболевания и отсутствие новых очагов	снижение СПД на 50% или более для вплоть до 6 крупнейших основных масс; отсутствие увеличения размера других узлов (а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; одна или более ПЭТ-положительных в ранее пораженном участке (b) переменно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; регрессия на КТ	снижение СПД узелков на 50% или более (для одного узелка с наибольшим поперечным диаметром); отсутствие увеличения размера печени или селезенки	Неприменимо если положительный до терапии; должен быть указан тип клеток
СЗ	Недостижение ПР/ЧР или ПЗ	(а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; ПЭТ-положительные в предыдущих очагах заболевания и отсутствие новых очагов на КТ или ПЭТ (b) вариабельно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; отсутствие		

		изменений размеров ранее возникших очагов поражения на КТ		
ПЗ или рецидив заболевания	Любой новый очаг поражения или увеличение на 50% или более ранее пораженных участков от самого низкого уровня	Появление нового (ых) очага (ов) размером 1,5 см или более по любой оси, увеличение СПД на 50% или более для более чем одного узла, или увеличение на 50% или более самого длинного диаметра ранее идентифицированного узла размером 1 см или более по короткой оси Очаги поражений ПЭТ-положительны, если лимфома поглощает ФДГ или ПЭТ-положительна до терапии	увеличение СПД любых ранее возникших очагов поражения на 50% или более от самого низкого уровня	Новое или рецидивирующее поражение

Сокращения: ПР - полная ремиссия; ФДГ [¹⁸F]фтордезоксиглюкоза; ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография; КТ - компьютерная томография; ЧР - частичная ремиссия; СПД - сумма произведений диаметров; СЗ - стабильное заболевание; ПЗ - прогрессирующее заболевание.

Конечная точка	Пациенты	Определение	Начало измерений
Первичные			
Общая выживаемость	Все	Смерть по любой причине	Включение в исследование
Выживаемость без прогрессирования	Все	Прогрессирование заболевания или смерть по любой причине	Включение в исследование
Вторичные			
Бессобытийная выживаемость	Все	Неэффективность лечения или смерть по любой причине	Включение в исследование
Время до прогрессирования	Все	Время до прогрессирования или смерти в результате лимфомы	Включение в исследование
Безрецидивная выживаемость	При ПР	Время до рецидива или смерти в результате лимфомы или острой токсичности лечения	Регистрация ответа
Продолжительность ответа	При ПР или ЧР	Время до рецидива или прогрессирования	Регистрация ответа
Лимфома-специфическая выживаемость	Все	Время до смерти в результате лимфомы	Включение в исследование
Время до следующего лечения	Все	Время до нового лечения	Окончание первичного лечения

Сокращения: ПР - полная ремиссия; ЧР - частичная ремиссия.

В одном из вариантов осуществления конечной точкой для лимфомы является доказательство клинической пользы. Клиническая польза может отражать улучшение качества жизни или снижение симптомов пациента, потребностей в переливании, частых инфекций или других параметров. В этой конечной точке также можно использовать время до повторного возникновения или прогрессирования симптомов, связанных с лимфомой.

В некоторых вариантах лечение лимфомы может быть оценено с помощью Международных экспертных критериев (IWC) для неходжкинской лимфомы (НХЛ) (см. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et. al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. J. Clin. Oncol: 2007: (25) 579-586), используя определения ответа и конечных точек, приведенные ниже:

Ответ	Определение	Узловые массы	Селезенка, печень	Костный мозг
ПР	Исчезновение всех проявлений заболевания	(а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; допускается масса любого размера в случае отрицательной ПЭТ (b) вариабельно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; регрессия до нормального размера на КТ	Не прощупывается, узелки исчезли	Инфильтрат не обнаружен на повторной биопсии; если неопределимо посредством морфологического анализа, иммуногистохимия должна быть отрицательной
ЧР	Регрессия измеримых проявлений заболевания и отсутствие новых очагов	снижение СПД на 50% или более для вплоть до 6 крупнейших основных масс; отсутствие увеличения размера других узлов	снижение СПД узелков на 50% или более (для одного узелка с наибольшим поперечным диаметром); отсутствие увеличения	Неприменимо если положительный до терапии; должен быть указан тип клеток
		(а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; одна или более ПЭТ-положительных в ранее пораженном участке (b) переменно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; регрессия на КТ	размера печени или селезенки	
СЗ	Недостижение ПР/ЧР или ПЗ	(а) поглощающие ФДГ или ПЭТ-положительные до терапии; ПЭТ-положительные в предыдущих очагах заболевания и отсутствие новых очагов на КТ или ПЭТ (b) вариабельно поглощающие ФДГ или ПЭТ-отрицательные; отсутствие изменений размеров ранее возникших очагов поражения на КТ		
ПЗ или рецидив в заболевании	Любой новый очаг в поражения или увеличение	Появление нового (ых) поражения (ий) размером 1,5 см или более по	увеличение СПД любых ранее возникших очагов поражения на	Новое или рецидивирующее поражение

на 50% или более ранее пораженных участков от самого низкого уровня	любой оси, увеличение СПД на 50% или более для более чем одного узла, или увеличение на 50% или более самого длинного диаметра ранее идентифицированн ого узла ≥ 1 см по короткой оси	50% или более от самого низкого уровня	
	Очаги поражений ПЭТ-положительны, если лимфома поглощает ФДГ или ПЭТ-положительна до терапии		

Сокращения: ПР - полная ремиссия; ФДГ [^{18}F]фтордезоксиглюкоза; ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография; КТ - компьютерная томография; ЧР - частичная ремиссия; СПД сумма произведений диаметров; СЗ - стабильное заболевание; ПЗ - прогрессирующее заболевание.

Конечная точка	Пациенты	Определение	Начало измерений
Первичные			
Общая выживаемость	Все	Смерть по любой причине	Включение в исследование
Выживаемость без прогрессирования	Все	Прогрессирование заболевания или смерть по любой причине	Включение в исследование
Вторичные			
Бессобытийная выживаемость	Все	Неэффективность лечения или смерть по любой причине	Включение в исследование
Время до прогрессирования	Все	Время до прогрессирования или смерти в результате лимфомы	Включение в исследование
Безрецидивная выживаемость	При ПР	Время до рецидива или смерти в результате лимфомы или острой токсичности лечения	Регистрация ответа
Продолжительность ответа	При ПР или ЧР	Время до рецидива или прогрессирования	Регистрация ответа
Лимфома-специфическая выживаемость	Все	Время до смерти в результате лимфомы	Включение в исследование
Время до следующего лечения	Все	Время до нового лечения	Окончание первичного лечения

Сокращения: ПР - полная ремиссия; ЧР - частичная ремиссия.

В одном из вариантов осуществления конечной точкой для лимфомы является доказательство клинической пользы. Клиническая польза может отражать улучшение качества жизни или снижение симптомов пациента, потребности в переливании, частых инфекций или других параметров. В этой конечной точке также можно использовать время до повторного возникновения или прогрессирования симптомов, связанных с лимфомой.

В некоторых вариантах лечение ХЛЛ (хронического лимфоцитарного лейкоза) может быть оценено с помощью Международных экспертных критериев по ХЛЛ (см. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood, 2008; (111) 12:5446-5456), используя приведенные в них определения ответа и конечных точек, и, в частности:

Параметр	ПР	ЧР	ПЗ
Группа А			
Лимфаденопатия [†]	Нет > 1,5 см	Уменьшение на 50% или более	Увеличение на 50% или более
Гепатомегалия	Нет	Уменьшение на 50% или более	Увеличение на 50% или более
Спленомегалия	Нет	Уменьшение на 50% или более	Увеличение на 50% или более
Лимфоциты крови	< 4000/мкл	Уменьшение на 50% или более от исходного уровня	Увеличение на 50% или более по сравнению с исходным уровнем
Костный мозг [‡]	Нормоклеточный, <30% лимфоцитов, отсутствие В-лимфоидных узелков. Гипоцеллюлярный костный мозг определяет ПРН (полная ремиссия с неполным восстановлением костного мозга) (5.1.6).	уменьшение на 50% инфильтрата костного мозга или В-лимфоидных узелков	
Группа В			
Количество тромбоцитов	> 100 000/мкл	> 100 000/мкл или увеличение на 50% или более по сравнению с исходным уровнем	Уменьшение на 50% или более от исходного уровня вследствие ХЛЛ
Гемоглобин	> 11,0 г/дл	> 11 г/дл или увеличение на 50% или более по сравнению с исходным уровнем	Уменьшение более чем на 2 г/дл от исходного уровня вследствие ХЛЛ
Нейтрофилы [†]	> 1500/мкл	> 1500/мкл или улучшение более чем на 50% по сравнению с исходным уровнем	

Критерии группы А определяют опухолевую нагрузку; критерии группы В определяют функцию кроветворной системы (или костного мозга). ПР (полная ремиссия): все критерии должны быть удовлетворены, и пациенты должны не иметь связанных с заболеванием симптомов, свидетельствующих о генерализации патологического процесса; ЧР (частичная ремиссия): по крайней мере два критерия группы А плюс один из критериев группы В должны быть удовлетворены; СЗ представляет собой отсутствие прогрессирующего заболевания (ПЗ) и достижения хотя бы ЧР; ПЗ: по меньшей мере один из вышеуказанных критериев группы А или группы В должен быть удовлетворен. Сумма произведений нескольких лимфатических узлов (оценка по сканам КТ в клинических исследованиях или с помощью медицинского осмотра в ходе общей практики). Эти параметры неприменимы к некоторым категориям ответов.

В некоторых вариантах осуществления лечение множественной миеломы может быть оценено с помощью Международных единых критериев ответа для множественной миеломы (IURC) (см. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10) 10: 1-7), используя определения ответа и конечных точек, приведенные ниже:

Подкатегория ответа	Критерии ответа ^а
СПО	ПО, как определено ниже, плюс Нормальное отношение СЛЦ и Отсутствие клональных клеток в костном мозге ^б при оценке с помощью иммуногистохимии или иммунофлуоресценции ^с
ПО	Отрицательная иммунофиксация сыворотки и мочи и Исчезновение всех плазматом мягких тканей и <5% клеток плазмы в костном мозге ^б
ОХЧО	М-белок сыворотки и мочи обнаруживается с помощью иммунофиксации, но не обнаруживается с помощью электрофореза, или снижение содержания М-белка в сыворотке на 90% или более плюс уровень М-белка мочи <100 мг за 24 ч
ЧО	снижение содержания М-белка в сыворотке на 50% или более и снижение содержания М-белка в моче за 24 ч на 90% или более, или до <200 мг за 24 ч Если М-белок сыворотки и мочи не поддаются измерению, ^д вместо критерия М-белка необходимо снижение на 50% или более разницы между уровнями вовлеченных и невовлеченных СЛЦ Если М-белок сыворотки и мочи не поддаются измерению, и исследование свободных легких цепей в сыворотке также не поддается измерению, то вместо М-белка необходимо снижение на 50% или более клеток плазмы, при условии, что исходный процент клеток плазмы костного мозга составлял ≥30%
	составлял ≥30% Помимо перечисленных выше критериев, также необходимо снижение на 50% или более размера плазматом мягких тканей, если они присутствовали на исходном уровне
СЗ (не рекомендуется для использования в качестве индикатора ответа, стабильность заболевания лучше всего описывается путем предоставления оценок времени до прогрессирования)	Не соответствуют критериям ПО, ОХЧО, ЧО или прогрессирующего заболевания

Сокращения: ПО - полный ответ; СЛЦ - свободная легкая цепь; ЧО - частичный ответ; СЗ - стабильное заболевание; СПО - строгий полный ответ; ОХЧО - очень хороший частичный ответ;

^аДля всех категорий ответа необходимо проведение двух последовательных оценок, проведенных в любое время до назначения любой новой терапии; для всех категорий также необходимо отсутствие каких-либо известных признаков прогрессирующих или новых очагов поражения кости в случае проведения рентгенографических исследований. Рентгенографические исследования не требуются для удовлетворения этих требований к ответам;

^бПодтверждение с помощью повторной биопсии костного мозга не требуется;

^сНаличие/отсутствие клональных клеток основано на соотношении κ/λ. При определении аномального соотношения κ/λ с помощью иммуногистохимии и/или иммунофлуоресценции для анализа необходимо не менее 100 клеток плазмы. Аномальное соотношение, отражающее наличие аномального клона, составляет κ/λ>4:1 или <1:2.

^дИзмеримое заболевание, определяемое по меньшей мере одним из следующих измерений: клетки плазмы костного мозга ≥30%; М-белок сыворотки ≥1 г/дл (10 мг/л) [10 г/л]; М-белок мочи ≥200 мг/24 ч; Анализ СЛЦ сыворотки: уровень вовлеченных СЛЦ ≥10 мг/дл (≥100 мг/л); при условии, что соотношение СЛЦ в сыворотке является аномальным.

В некоторых вариантах осуществления лечение рака может быть оценено с помощью Критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1) (см. Thereasse P., et al. New Guidelines to Evaluate the Re-

sponse to Treatment in Solid Tumors. J. of the National Cancer Institute; 2000; (92) 205-216 и Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J., et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). European J. Cancer; 2009; (45) 228-247). Общие ответы для всех возможных комбинаций ответов опухолей в целевых и нецелевых очагах при появлении новых очагов или в отсутствие появления новых очагов представляют собой следующие:

Целевые очаги	Нецелевые очаги	Новые очаги	Общий ответ
ЧО	ПО	Нет	ПО
ПО	Неполный ответ/СЗ	Нет	ЧО
ЧО	Непрогрессирующее заболевание	Нет	ЧО
СЗ	Непрогрессирующее заболевание	Нет	СЗ
ПЗ	Любой	Да или нет	ПЗ
Любой	ПЗ	Да или нет	ПЗ
Любой	Любой	Да	ПЗ

ПО=полный ответ; ЧО=частичный ответ; СЗ=стабильное заболевание; и ПЗ=прогрессирующее заболевание.

В отношении оценки целевых очагов полный ответ (ПО) представляет собой исчезновение всех целевых очагов, частичный ответ (ЧО) представляет собой уменьшение по меньшей мере на 30% суммы самых длинных диаметров целевых очагов, принимая в качестве исходного значения сумму самых длинных диаметров на исходном уровне, прогрессирующее заболевание (ПЗ) представляет собой увеличение по меньшей мере на 20% суммы самых длинных диаметров целевых поражений, принимая в качестве исходного значения наименьшую сумму самых длинных диаметров, зарегистрированную с начала лечения или появления одного или более новых очагов, и стабильное заболевание (СЗ) не представляет собой ни достаточное уменьшение, чтобы соответствовать критериям частичного ответа, ни достаточное увеличение, чтобы соответствовать критериям прогрессирующего заболевания, принимая в качестве исходного значения наименьшую сумму самых длинных диаметров, зарегистрированную с начала лечения.

В отношении оценки нецелевых очагов полный ответ (ПО) представляет собой исчезновение всех нецелевых очагов и нормализацию уровня опухолевых маркеров; неполный ответ/стабильное заболевание (СЗ) представляет собой устойчивость одного или более нецелевых очагов и/или поддержание уровня опухолевых маркеров выше пределов нормы, и прогрессирующее заболевание (ПЗ) представляет собой появление одного или более новых очагов и/или однозначное прогрессирование существующих нецелевых очагов.

Приведенные ниже процедуры, соглашения и определения дают руководство по выполнению рекомендаций по оценке ответа в нейроонкологии (RANO) в отношении критериев ответа глиом высокой степени злокачественности (Wen P., Macdonald, DR., Reardon, DA., et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. J Clin Oncol 2010; 28: 1963-1972). Первичные изменения критериев RANO для критериев ответа опухолей в конкретные моменты времени (Time Point Responses, TPR) могут включать добавление соглашений в работе для определения изменений в дозе глюкокортикоидов и удаление компонента клинического ухудшения состояния субъекта для концентрации на объективных рентгенологических оценках. Исходное МРТ-сканирование определено как оценка, проводимая в конце периода послеоперационного отдыха, до начала или повторного начала лечения соединением. Исходная МРТ используется как исходное значение для оценки полного ответа (ПО) и частичного ответа (ЧО). В свою очередь, наименьшая СПД (сумма произведений перпендикулярных диаметров), полученная либо на исходном уровне, либо при последующих оценках, будет определена как оценка на самом низком уровне и использована в качестве исходного значения для определения прогрессирования. В течение 5 дней, предшествующих любому определенному протоколом МРТ-сканированию, субъекты либо не получают глюкокортикоидов, либо получают стабильную дозу глюкокортикоидов. Стабильная доза определена как одна и та же суточная доза в течение 5 последовательных дней, предшествующих МРТ-сканированию. Если назначенная доза глюкокортикоидов изменяется в течение 5 дней до проведения исходного сканирования, необходимо проведение нового исходного сканирования при применении глюкокортикоидов, соответствующем описанным выше критериям. Будут использованы следующие определения.

Измеримые очаги: измеримые очаги представляют собой накапливающие контраст очаги, которые могут быть измерены двумерно. Измеряется максимальный диаметр накапливающей контраст опухоли (также известный как самый длинный диаметр, LD). Наибольший перпендикулярный диаметр измеряют на том же изображении. Перекрестия двумерных измерений должны пересекаться, и рассчитывают произведение этих диаметров.

Минимальный диаметр: T1-взвешенное изображение, в котором секции составляют 5 мм с пропуском 1 мм. Минимальный LD измеримого очага устанавливают как 5 мм на 5 мм. Для включения и/или

обозначения в качестве целевых очагов могут потребоваться большие диаметры. После исходного уровня целевые очаги, ставшие меньше минимальных требований к измерению или более не поддающиеся двумерному измерению, регистрируются с величиной по умолчанию 5 мм для каждого диаметра менее 5 мм. Исчезнувшие очаги регистрируют как 0 на 0 мм.

Многоцентровые очаги: очаги, которые считаются многоцентровыми (в отличие от непрерывных) представляют собой очаги, в которых в промежутке между двумя (или более) очагами находится нормальная ткань головного мозга. Для многоцентровых очагов, представляющих собой отдельные центры накопления контраста, подход заключается в том, чтобы отдельно измерять каждый накапливающий контраст очаг, соответствующий критериям включения. Если между двумя (или более) очагами нет нормальной ткани головного мозга, они будут считаться одним и тем же очагом.

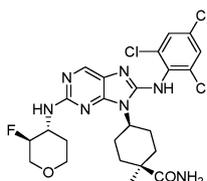
Неизмеримые очаги: все очаги, не соответствующие критериям измеримого заболевания, как определено выше, считаются неизмеримыми очагами, а также ими считаются все ненакапливающие контраст и другие принципиально неизмеримые очаги. Неизмеримые очаги включают центры накопления контраста, размер которых меньше указанного наименьшего диаметра (т. е. менее 5 на 5 мм), ненакапливающие контраст очаги (например, как видно на T1-взвешенных постконтрастных, T2-взвешенных изображениях или изображениях режима инверсия-восстановление с подавлением сигнала свободной воды (FLAIR)), геморрагические или преимущественно кистозные или некротические очаги и лептоменингеальную опухоль. Геморрагическим очагам часто свойственен гиперинтенсивный сигнал на T1-взвешенных изображениях, который может быть неверно истолкован как накапливающая контраст опухоль, и по этой причине может быть исследовано T1-взвешенное предконтрастное изображение с целью исключения исходного значения или интервального подострого кровоизлияния.

На исходном уровне очаги классифицируют следующим образом: целевые очаги: до 5 измеримых очагов могут быть выбраны в качестве целевых очагов, каждый из которых имеет размер по меньшей мере 10 на 5 мм, отражающие заболевание субъекта; нецелевые очаги: все другие очаги, включая все неизмеримые очаги (включая масс-эффекты и результаты T2/FLAIR), и любой измеримый очаг, не выбранный в качестве целевого очага. На исходном уровне целевые очаги должны быть измерены, как описано в определении для измеримых очагов, и необходимо определить СПД всех целевых очагов. Наличие всех других очагов должно быть зарегистрировано. При всех оценках после лечения исходную классификацию очагов на целевые и нецелевые сохраняют, и единообразно регистрируют и описывают очаги с течением времени (например, записывают в том же порядке в исходных документах и электронной истории болезни). Все измеримые и неизмеримые очаги должны быть оценены с использованием той же методики, что и на исходном уровне (например, субъекты должны проходить сканирование на одном и том же сканере МРТ или, по меньшей мере, с той же силой магнита) на протяжении всего исследования, чтобы уменьшить трудности при интерпретации изменений. При каждой оценке измеряют целевые очаги и рассчитывают СПД. Нецелевые очаги оценивают качественно, а новые очаги в случае их появления регистрируют отдельно. При каждой оценке определяют ответ в конкретный момент времени для целевых очагов, нецелевых очагов и нового очага.

Прогрессирование опухоли может быть установлено, даже если оценивается только выборка очагов. Однако, если не наблюдается прогрессирование, объективный статус (стабильное заболевание, ЧО или ПО) может быть определен только при оценке всех очагов.

Подтверждающие оценки общих ответов ПО и ЧО в конкретный момент времени проводят при следующей запланированной оценке, но подтверждение не может быть установлено, если между сканированиями прошло менее 28 дней. Наилучший ответ, охватывающий требования по подтверждению, получают на основе серии конкретных моментов времени.

В настоящем документе предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9H-пурин-9-ил)-1-метилциклогексанкарбоксамид, имеющего следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемой соли или таутомера, где рак представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, почечно-клеточную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, гепатоклеточную карциному, рак печени, рак легких, рак поджелудочной железы, лейкоз или множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой колоректальный рак, рак желудка, рак толстой кишки или рак желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак печени, рак легких

или рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой лейкоз или множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой гепатоклеточную карциному.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак, экспрессирующий PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, экспрессирующий PD-L1, представляет собой рак легкого, почечно-клеточную карциному или гепатоклеточную карциному.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак, характеризующийся мутацией BRAF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация BRAF представляет собой BRAF V660E.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак характеризуется мутацией NRAS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак характеризуется мутацией KRAS.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак, характеризующийся мутацией KRAS, представляет собой колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак характеризуется активированным сигнальным путем бета-катенина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аминопуриновое соединение вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой гепатоклеточную карциному или рак желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак дополнительно характеризуется мутацией EGFR или повышенной активностью EGFR.

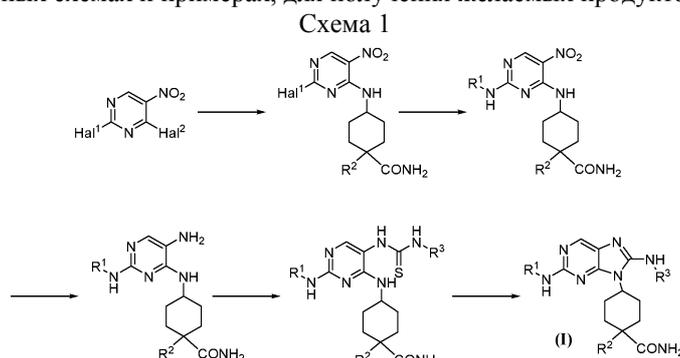
В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация EGFR представляет собой одну или более из EGFR E282K, G719S, P753S или V1011M.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак дополнительно характеризуется мутацией BRAF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутация BRAF включает мутацию BRAF V660E, BRAF T119S или BRAF G596R.

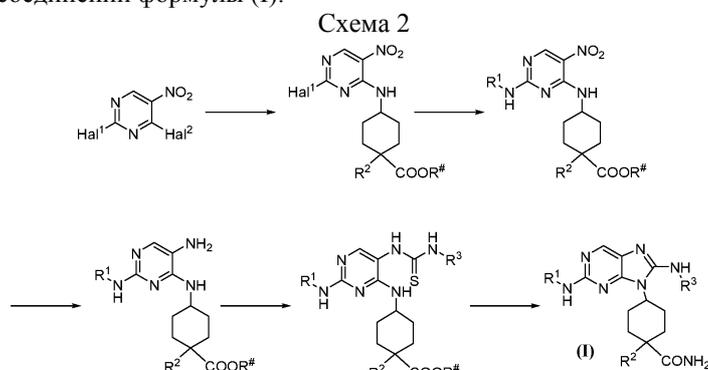
Способы получения аминопуриновых соединений

Аминопуриновые соединения могут быть получены с использованием общепринятых методов органического синтеза и коммерчески доступных исходных веществ. В качестве примера, но не ограничения, аминопуриновые соединения формулы (I) могут быть получены, как описано в патенте США № 7,723,340, патенте США № 8,158,635 и заявке на патент США № 14/874,513, или как показано на схеме 1, приведенной ниже, а также в приведенных в настоящем документе примерах. Следует отметить, что специалисту в данной области техники известно, каким образом нужно модифицировать методики, изложенные в иллюстративных схемах и примерах, для получения желаемых продуктов.

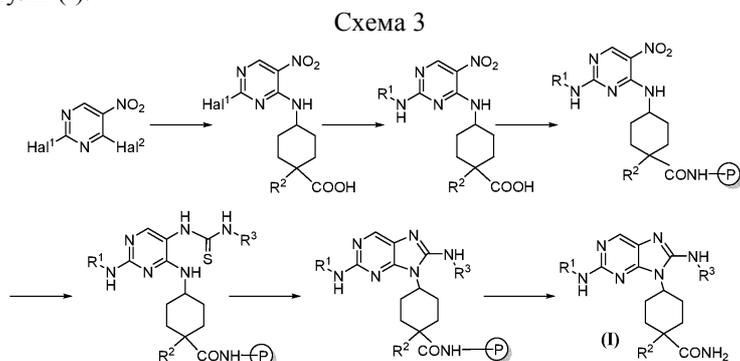


Как показано на схеме 1, соединения формулы (I), где R^1 , R^2 и R^3 представляют собой такие, как определено в настоящем документе, могут быть получены при использовании в качестве исходного вещества соответствующим образом замещенного нитропиримидина, где Hal^1 представляет собой Cl, и Hal^2 представляет собой Cl. Обработка дигалогенированного нитропиримидина соответствующим производным 4-аминоциклогексан-1-карбоксамида в присутствии основания, такого как, например, ДИЭА (диизопропилэтиламин), ТЭА (триэтианоламин) или пиридин, в растворителе, таком как, например, ДХМ (дихлорметан) или ТГФ (тетрагидрофуран), при пониженной температуре (например, при -78°C), обеспечивала присоединение циклогексиламидной боковой цепи. Обработка этого продукта $R^1\text{NH}_2$, в присутствии основания, такого как ДИЭА, ТЭА или пиридин, в растворителе, таком как ДХМ, ТГФ, диоксан или ДМФА (N,N-диметилформамид), при повышенной температуре (например, при $25\text{--}80^\circ\text{C}$) приводила к

присоединению боковой цепи R^1 . Восстановление нитрогруппы с использованием, например, водорода в присутствии катализатора, такого как Pd/C, в растворителе, таком как MeOH или этилацетат, давало производное аминопиримидина. Производное аминопиримидина обрабатывали R^3NCS , в растворителе, таком как ТГФ, ДМФА, НМП (N-метил-2-пирролидон), диоксан или EtOH, с получением (необязательно выделенного) производного тиомочевины, которое циклизовали, используя, например, ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) или ДИК (N,N'-диизопропилкарбодиимид), в растворителе, например ТГФ, диоксане, НМП или ДМФА, необязательно при повышенной температуре (например, при 40-80°C), с получением соединений формулы (I).



В качестве альтернативы, как показано на схеме 2, соединения формулы (I), где R^1 , R^2 и R^3 представляют собой такие, как определено в настоящем документе, и $R^{\#}$ представляет собой C_{1-2} алкил, могут быть получены при использовании, аналогично указанному выше, в качестве исходного вещества соответствующим образом замещенного нитропиримидина, где Hal^1 представляет собой Cl и Hal^2 представляет собой Cl. Обработка дигалогенированного нитропиримидина соответствующим алкилэфирным производным 4-аминоциклогексан-1-карбоксилата в присутствии основания, такого как ДИЭА, ТЭА или пиридин, в растворителе, таком как ДХМ или ТГФ, при пониженной температуре (например, при -78°C), обеспечивала присоединение боковой цепи циклогексилалкилового сложного эфира. Обработка этого продукта R^1NH_2 в присутствии основания, такого как ДИЭА, ТЭА или пиридин, в растворителе, таком как ДХМ, ТГФ, диоксан или ДМФА, при повышенной температуре (например, при 25-80°C) приводила к присоединению боковой цепи R^1 . Восстановление нитрогруппы с использованием, например, водорода в присутствии катализатора, такого как Pd/C, в растворителе, таком как MeOH или этилацетат, давало производное аминопиримидина. Производное аминопиримидина обрабатывали R^3NCS , в растворителе, таком как ТГФ, ДМФА, НМП (N-метил-2-пирролидон), диоксан или EtOH, с получением (необязательно выделенного) производного тиомочевины, которое циклизовали, используя, например, EDC или DIC, в растворителе, например ТГФ, НМП, диоксане или ДМФА, необязательно при повышенной температуре (например, при 40-80°C), с получением замещенного производного диаминопурина. Омыление алкилового сложного эфира с использованием основания (такого как гидроксид лития, гидроксид натрия или гидроксид калия) в растворителе (таком как водный ТГФ, MeOH или EtOH), необязательно при повышенной температуре (например, при 40-80°C), с последующим образованием амида, посредством обработки NH_4Cl , в присутствии связующего агента (такого как, например, НАТУ (1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридин-3-оксид гексафторфосфат), КДИ (N,N'-карбонилдимидазол), НВТУ (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат), ЭДК, необязательно в комбинации с НОВт или этилхлорформиатом) и основания (такого как ДИЭА, ТЭА, пиридин, ДБУ (1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) или NMM (N-метилморфолин)), в растворителе, например, ДМФА, давало соединения формулы (I).



В третьем подходе соединения формулы (I), где R^1 , R^2 и R^3 представляют собой такие, как определено в настоящем документе, и P представляет собой твердый носитель, такой как смола, могут быть получены при использовании, аналогично указанному выше, в качестве исходного вещества соответ-

вующим образом замещенного нитропиримидина, где NaI^1 представляет собой Cl , и NaI^2 представляет собой Cl . Обработка дигалогенированного нитропиримидина соответствующим производным 4-аминоциклогексан-1-карбоксилата в присутствии основания, такого как ДИЭА, ТЭА или пиридин, в растворителе, таком как ДХМ или ТГФ, при пониженной температуре (например, при -78°C), обеспечивала присоединение циклогексилалкилкарбоксилатной боковой цепи. Обработка этого продукта R^1NH_2 , в присутствии основания, такого как ДИЭА, ТЭА или пиридин, в растворителе, таком как ДХМ, ТГФ, диоксан или ДМФА, при повышенной температуре (например, при $25-80^\circ\text{C}$) приводила к присоединению боковой цепи R^1 . Это промежуточное соединение связывали с твердым носителем, таким как полимерная смола (например, смола Ринка) с использованием связующего агента (например, НАТУ, КДИ, НВТУ, ЭДК, необязательно в комбинации с NOBt или этилхлорформиатом) в растворителе, например ДМФА, при повышенной температуре, например, при 50°C . Обработка связанного со смолой промежуточного соединения восстановителем (например, хлоридом хрома (II)) в растворителе (таком как смесь ДМФА/MeOH) приводила к восстановлению нитрогруппы. Полученную аминогруппу подвергали взаимодействию с R^3NCS , в растворителе, например, EtOH, при повышенной температуре, например, при $40-60^\circ\text{C}$, с получением промежуточного продукта, представляющего собой производное тиомочевины. Этот промежуточный продукт циклизовали, используя, например, EDC или ДИК, в растворителе, например, ТГФ, НМП, диоксане или ДМФА, необязательно при повышенной температуре (например, при $40-80^\circ\text{C}$), с получением связанного со смолой производного диаминопурина. Наконец, обработка кислотой (например, обработка TFA (трифторуксусной кислотой) в растворителе, таком как ДХМ), приводила к отделению соединений формулы (I) от смолы.

Способы применения

Аминопуриновые соединения пригодны в качестве лекарственных средств для лечения, предупреждения или улучшения состояний у животных или людей. Соответственно, в настоящем документе предложены аминокпуриновые соединения и содержащие их фармацевтические композиции, которые могут быть использованы во всех способах, предложенных в настоящем документе. В частности, аминокпуриновые соединения, предложенные в настоящем документе, предназначены для применений в лечении или предупреждении рака. Способы, предложенные в настоящем документе, включают введение эффективного количества одного или более аминокпуриновых соединений субъекту, нуждающемуся в этом. Следует понимать, что описанные в настоящем документе способы также включают лечение фармацевтической композицией, такой как описанная ниже, где фармацевтическая композиция включает аминокпуриновое соединение, описанное в настоящем документе, и необязательно по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В другом аспекте предложены способы лечения или предупреждения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокпуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления рак не представляет собой меланому.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой меланому, колоректальный рак, рак желудка, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак ЦНС, рак легкого, рак поджелудочной железы и рак мягких тканей. В одном из вариантов осуществления солидная опухоль представляет собой эндокринный рак, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак двенадцатиперстной кишки, глиому, рак головы и шеи, рак почки, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого НМРЛ), рак пищевода, рак щитовидной железы или рак поджелудочной железы.

В другом варианте осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы (например, Нег-позитивный, Нег-негативный или EGFR-позитивный), рак ЦНС (включая нейробластому и глиому), рак толстой кишки, рак желудочно-кишечного тракта (например, рак желудка и рак толстой кишки), эндокринный рак (например, рак щитовидной железы или рак надпочечников), рак женской мочеполовой системы (например, рак шейки матки, светлоклеточный рак яичника, рак вульвы, рак матки или рак яичника), рак головы и шеи, рак кроветворной системы (например, лейкоз или миелому), рак почки, рак печени, рак легкого (например, НМРЛ или МРЛ), меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак мягких тканей (например, саркому или остеосаркому).

В другом варианте осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы (например, Нег-позитивный, Нег-негативный или EGFR-позитивный), рак ЦНС (например, глиому или нейробластому), рак толстой кишки, рак желудочно-кишечного тракта (например, рак желудка), эндокринный рак (например, рак щитовидной железы или рак надпочечников), рак женской мочеполовой системы (например, рак матки, шейки матки, светлоклеточный рак яичника или вульвы), рак головы и шеи, рак кроветворной системы (например, лейкоз или миелому), рак почки, рак печени, рак легкого (например, НМРЛ или МРЛ), меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак мягких тканей (например, саркому или остеосаркому).

В еще одном варианте осуществления рак представляет собой рак, указанный в табл. 3.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения гепатоклеточной

карциномы (ГКК), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокупринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения колоректального рака (КРР), меланомы, рака желудка, ГКК, рака легкого, рака поджелудочной железы, лейкоза или множественной миеломы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокупринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления КРР, рак желудка или ГКК представляет собой рак, характеризующийся мутацией β -катенина. В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения колоректального рака (КРР), рака желудка, ГКК, рака легкого, рака поджелудочной железы, лейкоза и множественной миеломы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокупринового соединения, как описано в настоящем документе.

В еще одном варианте осуществления предложены способы лечения лейкоза, включающие введение аминокупринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции. Лейкоз может представлять собой хронической миелогенной лейкоз (ХМЛ). В другом варианте осуществления лейкоз представляет собой острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). В одном из вариантов осуществления лейкоз представляет собой FLT-3-мутированный ОМЛ.

В еще одном варианте осуществления предложены способы лечения лимфомы, включающие введение аминокупринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции. Лимфома может представлять собой лимфому Беркитта. В одном из вариантов осуществления лейкоз представляет собой лимфому Ходжкина. В другом варианте осуществления лейкоз представляет собой В-клеточную лимфому. В другом варианте осуществления лейкоз представляет собой Т-клеточную лимфому. В еще одном варианте осуществления лимфома представляет собой первичную эффузионную лимфому (ПЭЛ).

Аминокуприновые соединения (на примере Соединения 1) демонстрируют антипролиферативную активность в различных линиях раковых клеток. (табл. 3) Антипролиферативная активность в этих линиях раковых клеток указывает на то, что аминокуприновые соединения пригодны для лечения рака, включая опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли. В одном из вариантов осуществления опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли выбраны из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, нейробластомы, медуллобластомы и глиомы), рака толстой кишки, рака двенадцатиперстной кишки, эндокринного рака (например, рака щитовидной железы и рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака матки, рака шейки матки, рака яичника и рака вульвы), рака головы и шеи (например, рака пищевода), рака кроветворной системы и лимфоидного рака (например, лимфомы, лейкоза и миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ и МРЛ), рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи (например, меланомы и карциномы), рака мягких тканей (например, саркомы и остеосаркомы), рака желудка и рака яичка. В одном из вариантов осуществления опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли выбраны из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, нейробластомы, медуллобластомы и глиомы), рака толстой кишки, рака двенадцатиперстной кишки, эндокринного рака (например, рака щитовидной железы и рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака матки, рака шейки матки и рака вульвы), рака головы и шеи, рака кроветворной системы и лимфоидного рака (например, лимфомы, лейкоза и миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ и МРЛ), рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи (например, меланомы и карциномы), рака мягких тканей (например, саркомы и остеосаркомы), рака желудка и рака яичка. В одном из вариантов осуществления рак представляет собой ГКК. В одном из вариантов осуществления рак представляет собой КРР. Такие раковые заболевания могут характеризоваться мутацией β -катенина. В еще одном варианте осуществления такие раковые заболевания могут характеризоваться мутацией BRAF. В еще одном варианте осуществления такие раковые заболевания характеризуются наличием как мутации β -катенина, так и мутации BRAF.

В еще одном варианте осуществления аминокуприновые соединения (на примере Соединения 1) индуцируют апоптоз в различных линиях раковых клеток. Индукция апоптоза указывает на то, что аминокуприновые соединения пригодны для лечения рака, включая опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли. В одном из вариантов осуществления опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли выбраны из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, нейробластомы и глиомы), рака толстой кишки, рака двенадцатиперстной кишки, эндокринного рака (например, рака щитовидной железы и рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака матки, рака шейки матки, рака яичника и рака вульвы), рака головы и шеи (например, рака пищевода), рака кроветворной системы и лимфоидного рака (например, лимфомы, лейкоза и миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ и МРЛ), рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи (например, меланомы и карциномы), рака мягких тканей (например, саркомы и остеосаркомы), рака желудка и рака яичка. В одном из вариантов осуществления опухоли гемопозитической ткани и солидные опухоли выбраны из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, нейробластомы

и глиомы), рака толстой кишки, рака двенадцатиперстной кишки, эндокринного рака (например, рака щитовидной железы и рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака вульвы), рака головы и шеи (например, рака пищевода), рака кроветворной системы и лимфоидного рака (например, лимфомы и лейкоза), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ и МРЛ), рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи (например, меланомы), рака мягких тканей (например, саркомы и остеосаркомы), рака желудка и рака яичка. В одном из вариантов осуществления опухоли гемопоэтической ткани и солидные опухоли выбраны из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, медуллобластомы, нейробластомы и глиомы), рака толстой кишки, рака двенадцатиперстной кишки, эндокринного рака (например, рака щитовидной железы и рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака плаценты, рака матки, рака шейки матки, рака яичника и рака вульвы), рака головы и шеи (например, рака пищевода), рака кроветворной системы и лимфоидного рака (например, лимфомы, лейкоза и миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ и МРЛ), рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака кожи (например, меланомы и карциномы), рака мягких тканей (например, саркомы и остеосаркомы), рака желудка и рака яичка.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося мутацией BRAF и/или мутацией бета-катенина (также называемой мутацией CTNNB1), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак характеризуется мутацией BRAF. В другом варианте осуществления рак характеризуется мутацией бета-катенина. В еще одном варианте осуществления рак характеризуется активированным сигнальным путем бета-катенина. В некоторых таких вариантах осуществления рак представляет собой KPP или меланому, характеризующиеся мутацией BRAF. В других вариантах осуществления рак представляет собой KPP, характеризующийся мутацией бета-катенина, дополнительно включающий мутацию EGFR или повышенную активность EGFR (например, KPP, характеризующийся активированным сигнальным путем бета-катенина и мутацией EGFR, или KPP, характеризующийся активированным сигнальным путем бета-катенина и повышенной активностью EGFR). В других вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка, характеризующийся мутацией бета-катенина, дополнительно включающий мутацию KRAS (т. е. рак желудка, характеризующийся активированным сигнальным путем бета-катенина и мутацией KRAS). В еще одном варианте осуществления рак представляет собой ГКК, характеризующуюся активированным сигнальным путем бета-катенина. В некоторых таких вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой BRAF V660E. В других вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой одну или более из BRAF V600E, BRAF T119S или BRAF G596R. В некоторых таких вариантах осуществления мутация бета-катенина представляет собой одну или более бета-катенин S33Y, G34E, S45del или S33C. В некоторых таких вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или более из EGFR E282K, G719S, P753S или V1011M. В некоторых таких вариантах осуществления мутация KRAS представляет собой A146T, G12C, G12D, G12V, G13D или Q61L.

В настоящем документе предложены способы лечения KPP, характеризующегося мутацией бета-катенина, где мутация бета-катенина представляет собой одну или более из бета-катенин S33Y, G34E, S45del или S33C, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение представляет собой Соединение 1. В настоящем документе также предложены способы лечения KPP, характеризующегося мутацией бета-катенина, дополнительно включающего мутацию EGFR или повышенную активность EGFR, где мутация бета-катенина представляет собой одну или более из бета-катенин S33Y, G34E, S45del или S33C и мутация EGFR представляет собой одну или более из EGFR E282K, G719S, P753S или V1011M, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение представляет собой Соединение 1.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, экспрессирующего PD-L1, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак, экспрессирующий PD-L1, представляет собой меланому, рак легкого, почечно-клеточную карциному (ПКК) или ГКК.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося мутацией BRAF, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся мутацией BRAF, представляет собой KPP, рак щитовидной железы, меланому или рак легкого. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся мутацией BRAF, представляет собой KPP, рак щито-

видной железы или рак легкого. В некоторых таких вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой BRAF V660E. В других вариантах осуществления мутация BRAF представляет собой одну или более из BRAF V600E, BRAF T119S или BRAF G596R.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося мутацией NRAS, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся мутацией NRAS, представляет собой меланому.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося мутацией KRAS, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся мутацией KRAS, представляет собой KPP, рак поджелудочной железы или рак легкого. Мутация KRAS может представлять собой мутацию KRAS, как описано выше.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося мутацией бета-катенина, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака, характеризующегося активированным сигнальным путем бета-катенина, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся мутацией бета-катенина, представляет собой KPP, рак желудка, ГМК или саркому. В некоторых таких вариантах осуществления рак, характеризующийся активированным сигнальным путем бета-катенина, представляет собой KPP, рак желудка, ГМК или саркому. Мутация бета-катенина может представлять собой мутацию, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения гепатоклеточной карциномы (ГМК), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления ГМК характеризуется мутацией бета-катенина и/или повышенной экспрессией YAP. В некоторых таких вариантах осуществления ГМК характеризуется активированным сигнальным путем бета-катенина и/или повышенной амплификацией экспрессии YAP. В некоторых вариантах осуществления увеличенная экспрессия YAP обусловлена амплификацией или мутацией.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения колоректального рака (KPP), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления KPP характеризуется мутацией BRAF и/или мутацией бета-катенина. В некоторых таких вариантах осуществления KPP характеризуется мутацией BRAF и/или активированным сигнальным путем бета-катенина.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения рака желудка, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак желудка характеризуется мутацией гена бета-катенина. В некоторых таких вариантах осуществления рак желудка характеризуется активацией бета-катенина. Мутация бета-катенина может представлять собой мутацию, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения меланомы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления меланомы характеризуется мутацией BRAF и/или мутацией NRAS.

В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения гепатоклеточной карциномы (ГМК) с амплификацией C-Met. В одном из вариантов осуществления способ включает лечение ГМК с амплификацией C-Met путем введения эффективного количества аминокислотного соединения, описанного в настоящем документе, субъекту, имеющему ГМК с амплификацией C-Met. В еще одном варианте осуществления способ включает предупреждение ГМК с амплификацией C-Met путем введения профилактического количества аминокислотного соединения, описанного в настоящем документе, субъекту, имеющему ГМК с амплификацией C-Met.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминокислотным соединением у пациента, имеющего рак, характеризующийся генной мутацией, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение последовательности одного или более генов, выбранных из BRAF, NRAS, KRAS и/или CTNNB1 в указанном биологическом образце для исследования; в) сравнение указанной(ых) последова-

тельности(ей) гена(ов) с последовательностью(ами) гена(ов) биологического образца дикого типа; где наличие мутации указывает на повышенную вероятность ответа на лечение аминопуриновым соединением рака указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эффективности лечения аминопуриновым соединением пациента, имеющего рак, характеризующийся генной мутацией, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение последовательности(ей) одного или более генов, выбранных из BRAF, NAS, KRAS и/или CTNNB1 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанной(ых) последовательности(ей) гена(ов) с последовательностью(ами) гена(ов) биологического образца дикого типа; где наличие мутации указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминопуриновым соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения и предупреждения метастазов рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак, в частности метастатическую солидную опухоль или метастатическое гематологическое онкологическое заболевание, где солидная опухоль и гематологическое онкологическое заболевание представляют собой такие, как описано в настоящем документе. В других вариантах осуществления предложены способы лечения и предупреждения метастазов рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В еще одном аспекте предложены способы устранения раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

В еще одном аспекте предложены способы индукции дифференцировки раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В других вариантах осуществления предложены способы индукции гибели раковых стволовых клеток у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, как описано в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления предложены способы достижения Критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), представляющих собой полный ответ, частичный ответ или стабильное заболевание, у пациента, включающие введение эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, солидную опухоль, как описано в настоящем документе. В еще одном варианте осуществления предложены способы увеличения уровней выживаемости без прогрессирования, как определено с помощью оценки Каплана-Мейера. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления предложены способы предупреждения или задержки Критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), представляющих собой прогрессирование заболевания, у пациента, включающие введение эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему солидную опухоль, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления предупреждение или задержка прогрессирования заболевания характеризуется или достигается при изменении общего размера целевых очагов, например, от -30 до +20% по сравнению с состоянием до лечения. В еще одном варианте осуществления изменение размера целевых очагов представляет собой уменьшение общего размера более чем на 30%, например, уменьшение целевых очагов более чем на 50% по сравнению с состоянием до лечения. В другом случае предупреждение характеризуется или достигается при уменьшении размера или задержке прогрессирования нецелевых очагов по сравнению с состоянием до лечения. В одном из вариантов осуществления предупреждение достигается или характеризуется уменьшением количества целевых очагов по сравнению с состоянием до лечения. В другом случае предупреждение достигается или характеризуется уменьшением количества или качества нецелевых очагов по сравнению с состоянием до лечения. В одном из вариантов осуществления предупреждение достигается или характеризуется отсутствием или исчезновением целевых очагов по сравнению с состоянием до лечения. В другом случае предупреждение достигается или характеризуется отсутствием или исчезновением нецелевых очагов по сравнению с со-

охарактеризованного с помощью Международных экспертных критериев (IWC) для НХЛ (см. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; (25) 579-586), у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, гематологические онкологические заболевания, такие как лимфома, как описано в настоящем документе. В еще одном варианте осуществления предложены способы достижения полной ремиссии, частичной ремиссии или стабильного заболевания, как определено с помощью Международных экспертных критериев (IWC) для НХЛ, у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения пациенту, имеющему рак, в частности, гематологические онкологические заболевания, такие как лимфома, как описано в настоящем документе. В еще одном варианте осуществления предложены способы достижения увеличения общей выживаемости, выживаемости без прогрессирования, бессобытийной выживаемости, времени до прогрессирования, безрецидивной выживаемости или выживаемости без лимфомы, как определено с помощью Международных экспертных критериев (IWC) для НХЛ у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения пациенту, имеющему рак, в частности, гематологические онкологические заболевания, такие как лимфома, как описано в настоящем документе. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В еще одном варианте осуществления предложены способы индукции терапевтического ответа, оцениваемого с помощью Международных единых критериев ответа множественной миеломы (IURC) (см. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10) 10: 1-7), у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, множественную миелому. В еще одном варианте осуществления предложены способы достижения строгого полного ответа, полного ответа, очень хорошего частичного ответа или частичного ответа, как определено с помощью Международных единых критериев ответа множественной миеломы (IURC), у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, множественную миелому. В еще одном варианте осуществления предложены способы достижения увеличения общей выживаемости, выживаемости без прогрессирования, бессобытийной выживаемости, времени до прогрессирования или безрецидивной выживаемости у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, множественную миелому. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В еще одном варианте осуществления предложены способы индукции терапевтического ответа, оцениваемого с помощью рекомендаций по оценке ответа в нейроонкологии (RANO) для GBM (см. Wen P., Macdonald, DR., Reardon, DA., et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1963-1972), у пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, мультиформную глиобластому (GBM). В одном из вариантов осуществления RANO используют для определения доли пациентов без прогрессирования в течение 6 месяцев с первого дня лечения по отношению к поддающимся оценке эффективности субъектам с GBM. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В еще одном варианте осуществления предложены способы улучшения оценки общего состояния пациента по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG), включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, как описано в настоящем документе. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В еще одном варианте осуществления предложены способы индукции терапевтического ответа, оцениваемого по результатам позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) пациента, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, как описано в настоящем документе, включающие введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции пациенту, имеющему рак, в частности, солидную опухоль или гематологическое онкологическое заболевание, как описано в настоящем документе, где лечение приводит к снижению метаболической активности опухоли, например, как измерено с помощью ПЭТ. Такие способы являются пригодными и могут применяться в дополнение к способам лечения раковых заболеваний, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, аминопуриновое соединение представляет собой соединение, описанное в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение представляет собой соединение формулы (I). В еще одном варианте осуществления аминопуриновое соединение представляет собой соединение из табл. 1. В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение представляет собой аминопуриновое соединение, представленное в настоящем документе, имеющее молекулярную формулу $C_{24}H_{27}N_7O_2FCl_3$. В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение представляет собой (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2Н-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9Н-пурин-9-ил)-1-метилциклогексан-1-карбоксамид, имеющий альтернативное название цис-4-[2-{{{(3S,4R)-3-фтороксан-4-ил}амино}}-8-(2,4,6-трихлоранилино)-9Н-пурин-9-ил]-1-метилциклогексан-1-карбоксамид (Соединение 1).

В настоящем документе также предложены способы лечения пациентов, ранее получавших лечение от рака, в частности, солидной опухоли или гематологического онкологического заболевания, как описано в настоящем документе, а также пациентов, ранее не получавших лечение. В одном из вариантов осуществления рак представляет собой рак, представленный в табл. 3. Такие раковые заболевания могут быть подвергнуты лечению аминопуриновыми соединениями, описанными в настоящем документе, включая соединения, представленные в табл. 1, и/или соединение 1. Поскольку пациенты с раком имеют различные клинические проявления заболевания и различные клинические исходы, лечение, предписанное пациенту, может различаться в зависимости от его/ее прогноза. Специалисты в данной области техники могут легко, без излишних экспериментов, определить конкретные вторичные агенты, виды хирургического вмешательства и виды немедикаментозной стандартной терапии, которые можно эффективно использовать для лечения конкретного пациента с раком.

В одном из вариантов осуществления предложены способы модуляции уровней биомаркера у субъекта, имеющего рак, как описано в настоящем документе, включающие введение эффективного количества аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции указанному субъекту. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию биомаркера оценивают в биологическом образце субъекта, таком как циркулирующая кровь, биопсии кожи, биопсии опухоли, циркулирующие опухолевые клетки, волосы и/или моча. В одном из вариантов осуществления биологический образец представляет собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК). В таких вариантах осуществления величину модуляции биомаркера оценивают путем сравнения количества биомаркера до и после введения аминопуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями. В некоторых других вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой ERK, RSK1, DUSP4, DUSP5, DUSP6, BMF, EFNA1, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, GJA1, ИЛ-8, с-Мус, циклин D1, YAP, SPRY2, SPRY4, аксин 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1, MAFF, CITED2, ELF3 или PD-L1. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней фосфорилирования одного или более из ERK и RSK1. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями. В некоторых других вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из DUSP4, DUSP6, циклина D1, с-Мус, SPRY2 и YAP. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP6, циклина D1, с-Мус и YAP. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP6, SPRY2, с-Мус и циклина D1. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из DUSP4, DUSP6, циклина D1, с-Мус, SPRY2 и YAP. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP6, циклина D1, с-Мус и YAP. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP6, SPRY2, с-Мус и циклина D1. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из DUSP5,

DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, SPRY2 и SPRY4. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, SPRY2 и SPRY4. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из BMF и EFNA. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF и EFNA1. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой GJA1. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения модуляции уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из GJA1. В некоторых таких вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60%, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из актина 2, CTGF, Cug61 и AREG. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из актина 2, CTGF и AREG. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения уменьшения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой один или более из CITED2 и ELF3. В некоторых таких вариантах осуществления модуляцию измеряют путем измерения увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из CITED2 и ELF3. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления модуляция уровней биомаркера представляет собой уменьшение уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления модуляция биомаркера представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В другом варианте осуществления биомаркер представляет собой ИФН γ или ИЛ-2. В некоторых таких вариантах осуществления модуляция уровней биомаркера представляет собой увеличение уровней экспрессии мРНК и/или белка ИФН γ или ИЛ-2. В некоторых таких вариантах осуществления модуляция уровней экспрессии мРНК и/или белка ИФН γ или ИЛ-2 представляет собой увеличение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В другом варианте осуществления биомаркер представляет собой ИЛ-8. В некоторых таких вариантах осуществления модуляция уровней биомаркера представляет собой уменьшение уровней экспрессии мРНК и/или белка ИЛ-8. В некоторых таких вариантах осуществления модуляция уровней экспрессии мРНК и/или белка ИЛ-8 представляет собой уменьшение приблизительно на 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 99% или приблизительно на 100% по сравнению с исходными уровнями.

В настоящем документе также предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминокупуриновому соединению или содержащей его фармацевтической композиции, включающие введение указанному пациенту указанного аминокупуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции и определение того, ингибируется ли фосфорилирование ERK и/или RSK1 у указанного пациента путем измерения количества фосфорилированного ERK и/или RSK1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминокупуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции указанному пациенту, где ингибирование фосфорилирования ERK и/или RSK1 указывает на то, что указанный пациент является чувствительным к указанному аминокупуриновому соединению. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокупуринового соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления

биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

В настоящем документе также предложены способы определения эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции для лечения рака, поддающегося лечению путем ингибирования фосфорилирования ERK и/или RSK1, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции и определение величины ингибирования фосфорилирования ERK и/или RSK1 у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции путем измерения количества фосфорилированного ERK и/или RSK1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминокислотного соединения указанному пациенту, где ингибирование фосфорилирования ERK и/или RSK1 на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50% или более чем приблизительно 50% соответствует эффективному количеству аминокислотного соединения. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокислотного соединения или содержащей его фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминокислотным соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, актина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии мРНК и/или белка в указанном биологическом образце пациента для исследования относительно указанного биологического образца дикого типа указывает на повышенную вероятность ответа указанного рака пациента на лечение аминокислотным соединением. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокислотного соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эффективности лечения аминокислотным соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, актина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии мРНК и/или белка указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминокислотным соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокислотного соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминокислотному соединению, включающие введение указанному пациенту указанного аминокислотного соединения и определение того, ингибируются ли уровни экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, актина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF у указанного пациента путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, актина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминокислотного соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокислотного соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

зец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения эффективного количества аминокупинового соединения для лечения рака, поддающегося лечению путем ингибирования уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, аксина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминокупинового соединения и определение величины уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, аксина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминокупинового соединения путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из DUSP4, DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, сМус, циклина D1, YAP, SPRY2, SPRY4, аксина 2, CTGF, AREG, CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминокупинового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокупинового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминокупиновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где увеличение уровней экспрессии мРНК и/или белка в указанном биологическом образце пациента для исследования относительно указанного биологического образца дикого типа указывает на повышенную вероятность ответа указанного рака пациента на лечение аминокупиновым соединением. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокупинового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эффективности лечения аминокупиновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где увеличение уровней экспрессии мРНК и/или белка указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминокупиновым соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокупинового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминокупиновому соединению, включающие введение указанному пациенту указанного аминокупинового соединения и определение того, увеличиваются ли уровни экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3 у указанного пациента путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминокупинового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокупинового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения эффективного количества аминокупинового соединения для лечения рака, поддающегося лечению путем увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминокупинового соединения и определение величины увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2

и ELF3 у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминокпуринового соединения путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка одного или более из BMF, EFNA1, CITED2 и ELF3 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминокпуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокпуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминокпуриновым соединением или содержащей его фармацевтической композицией у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии мРНК и/или белка в указанном биологическом образце пациента для исследования относительно указанного биологического образца дикого типа указывает на повышенную вероятность ответа указанного рака пациента на лечение аминокпуриновым соединением. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокпуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эффективности лечения аминокпуриновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии мРНК и/или белка указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминокпуриновым соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокпуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминокпуриновому соединению, включающие введение указанному пациенту указанного аминокпуринового соединения и определение того, ингибируются ли уровни экспрессии мРНК и/или белка GJA1 у указанного пациента путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминокпуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокпуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения эффективного количества аминокпуринового соединения для лечения рака, поддающегося лечению путем ингибирования уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминокпуринового соединения и определение величины ингибирования уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминокпуринового соединения путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминокпуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминокпуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминокпуриновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологическо-

го образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где увеличение уровней экспрессии мРНК и/или белка в указанном биологическом образце пациента для исследования относительно указанного биологического образца дикого типа указывает на повышенную вероятность ответа указанного рака пациента на лечение аминопуриновым соединением. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эффективности лечения аминопуриновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии мРНК и/или белка с уровнями экспрессии мРНК и/или белка биологического образца дикого типа; где увеличение уровней экспрессии мРНК и/или белка указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминопуриновым соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминопуриновому соединению, включающие введение указанному пациенту указанного аминопуринового соединения и определение того, увеличиваются ли уровни экспрессии мРНК и/или белка GJA1 у указанного пациента путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминопуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения эффективного количества аминопуринового соединения для лечения рака, поддающегося лечению путем увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминопуринового соединения и определение величины увеличения уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминопуринового соединения путем измерения величины уровней экспрессии мРНК и/или белка GJA1 в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминопуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования ответа на лечение аминопуриновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности в указанном биологическом образце для исследования; с) сравнение указанных уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности с уровнями экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности указывает на повышенную вероятность ответа рака указанного пациента на лечение аминопуриновым соединением. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы прогнозирования терапевтической эф-

фektivности лечения аминопуриновым соединением у пациента, имеющего рак, где способ включает: а) получение биологического образца онкологического заболевания пациента для исследования; б) получение уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности в указанном биологическом образце для исследования; в) сравнение указанных уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности с уровнями экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности биологического образца дикого типа; где уменьшение уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности указывает на повышенную вероятность терапевтической эффективности указанного лечения аминопуриновым соединением у указанного пациента. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения, является ли пациент чувствительным к аминопуриновому соединению, включающие введение указанному пациенту указанного аминопуринового соединения и определение того, ингибируются ли уровни экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности у указанного пациента путем измерения величины уровней экспрессии экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения аминопуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Кроме того, в настоящем документе предложены способы определения эффективного количества аминопуринового соединения для лечения рака, поддающегося лечению путем уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности, у пациента, включающие введение указанному пациенту различных доз указанного аминопуринового соединения и определение величины ингибирования уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности у указанного пациента в результате введения каждой дозы указанного аминопуринового соединения путем измерения величины уровней экспрессии PD-L1 на клеточной поверхности в биологическом образце, взятом у указанного пациента до и после введения каждой дозы аминопуринового соединения указанному пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления способ дополнительно включает введение эффективного количества аминопуринового соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления биологический образец представляет собой биопсию опухоли. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой МНПК. В еще одном варианте осуществления биологический образец представляет собой циркулирующие опухолевые клетки.

Циклическая терапия

В некоторых вариантах реализации профилактические или терапевтические агенты, предложенные в настоящем документе, вводят пациенту циклически. Циклическая терапия включает введение активного агента в течение определенного периода времени, с последующим периодом отдыха, и повторение указанного последовательного введения. Циклическая терапия может снижать развитие резистентности к одному или более терапевтическим средствам, исключать или уменьшать побочные действия одного или более терапевтических средств и/или улучшать эффективность лечения.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, вводят ежедневно в виде разовой или дробной дозы в течение цикла от четырех до шести недель с периодом отдыха, составляющим приблизительно одну или две недели. В некоторых вариантах осуществления аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, вводят ежедневно в виде разовой или дробной дозы в течение от одного до десяти последовательных дней 28-дневного цикла, с последующим периодом отдыха без введения в течение остальных дней 28-дневного цикла. Циклический способ дополнительно обеспечивает возможность увеличения частоты, количества и продолжительности циклов введения доз. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено введение аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе, в течение большего количества циклов, чем обычно используется при отдельном введении. В некоторых вариантах осуществления аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, вводят в течение большего количества циклов, которое обычно вызвало бы дозолимитирующую токсичность у пациента, которому одновременно не вводят второй активный ингредиент.

В одном из вариантов осуществления аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, вводят ежедневно и непрерывно в течение трех или четырех недель в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 150 мг/сут, с последующим периодом отдыха в течение одной или двух недель.

В другом варианте осуществления аминопуриновое соединение, предложенное в настоящем документе, вводят внутривенно, а второй активный ингредиент вводят перорально, при этом введение аминопуриновых соединений осуществляют за 30-60 мин до введения второго активного ингредиента, в течение

ние цикла от четырех до шести недель. В некоторых вариантах осуществления комбинацию аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе, и второго активного ингредиента вводят посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно 90 мин на протяжении каждого цикла. В некоторых вариантах осуществления один цикл включает введение от приблизительно 0,1 до приблизительно 150 мг/сут аминопуринового соединения, предложенного в настоящем документе, и от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг/м²/сут второго активного ингредиента, ежедневно в течение от трех до четырех недель, с последующим периодом отдыха в течение одной или двух недель. В некоторых вариантах осуществления количество циклов, в течение которых пациенту вводят комбинационное лечение, составляет от приблизительно одного до приблизительно 24 циклов, от приблизительно двух до приблизительно 16 циклов или от приблизительно четырех до приблизительно трех циклов.

Фармацевтические композиции и способы введения

Аминопуриновые соединения могут быть введены субъекту перорально, местно или парентерально в обычной форме препаратов, таких как капсулы, микрокапсулы, таблетки, гранулы, порошок, таблетки, пилюли, суппозитории, инъекции, суспензии, сиропы, пластыри, кремы, лосьоны, мази, гели, спреи, растворы и эмульсии. Подходящие препараты могут быть получены обычно применяемыми способами, с использованием обычных органических или неорганических добавок, таких как эксципиент (например, сахароза, крахмал, маннит, сорбит, лактоза, глюкоза, целлюлоза, тальк, фосфат кальция или карбонат кальция), связующее (например, целлюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, полипропиленпирролидон, поливинилпирролидон, желатин, аравийская камедь, полиэтиленгликоль, сахароза или крахмал), разрыхлитель (например, крахмал, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилкрахмал, низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза, бикарбонат натрия, фосфат кальция или цитрат кальция), скользящее вещество (например, стеарат магния, легкая безводная кремниевая кислота, тальк или лаурилсульфат натрия), вкусоароматическая добавка (например, лимонная кислота, ментол, глицин или апельсиновый порошок), консервант (например, бензоат натрия, бисульфит натрия, метилпарабен или пропилпарабен), стабилизатор (например, лимонная кислота, цитрат натрия или уксусная кислота), суспендирующий агент (например, метилцеллюлоза, поливинилпирролидон или стеарат алюминия), диспергирующий агент (например, гидроксипропилметилцеллюлоза), разбавитель (например, вода) и базовый воск (например, какао-масло, медицинский вазелин или полиэтиленгликоль). Эффективное количество аминопуринового соединения в фармацевтической композиции может находиться на уровне, который будет оказывать желаемое действие; например, от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта в единичной дозе как для перорального, так и для парентерального введения.

Доза аминопуринового соединения для введения субъекту довольно широко варьируется и может подлежать оценке лечащего врача. В общем аминопуриновые соединения могут быть введены от одного до четырех раз в сутки в дозе от приблизительно 0,005 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта, но вышеуказанную дозу можно надлежащим образом изменять в зависимости от возраста, массы тела и медицинского состояния субъекта, а также от типа введения. В одном из вариантов осуществления доза составляет приблизительно 0,01 мг/кг массы тела субъекта приблизительно до 10 мг/кг массы тела субъекта, приблизительно 0,1 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта, приблизительно 1 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта или приблизительно 1 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 5 мг/кг массы тела субъекта. В одном из вариантов осуществления вводят одну дозу в сутки. В любом конкретном случае количество вводимого аминопуринового соединения будет зависеть от таких факторов, как растворимость активного компонента, используемая лекарственная форма и способ введения. В одном из вариантов осуществления применение концентрации для местного применения обеспечивает внутриклеточное воздействие или концентрацию, составляющую приблизительно 0,01-10 мкМ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения или предупреждения заболевания или расстройства, включающие введение от приблизительно 1 мг/сут до приблизительно 1000 мг/сут, от приблизительно от 1 мг/сут до приблизительно 750 мг/сут, от приблизительно 1 мг/сут до приблизительно 500 мг/сут, от приблизительно от 1 мг/сут до приблизительно 250 мг/сут или от приблизительно 100 мг/сут до приблизительно 1000 мг/сут аминопуринового соединения субъекту, нуждающемуся в этом.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены единичные лекарственные формы, содержащие от приблизительно 1 мг до 1000 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 10 мг и приблизительно 1000 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 250 мг до приблизительно 1000 мг аминопуринового соединения.

Аминопуриновое соединение может быть введено один, два, три, четыре или более раз в сутки. В конкретном варианте осуществления дозы, составляющие 600 мг или менее, вводят в виде однократной суточной дозы, а дозы, составляющие более 600 мг, вводят два раза в сутки в количестве, равном половине общей суточной дозы.

Аминопуриновое соединение может быть введено перорально по соображениям удобства. В одном

из вариантов осуществления, при пероральном введении, аминопуриновое соединение вводят с пищей и водой. В другом варианте осуществления аминопуриновое соединение диспергируют в воде или соке (например, яблочном соке или апельсиновом соке) и вводят перорально в виде суспензии.

Аминопуриновое соединение также может быть введено внутривожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, чрескожно, внутривенно, подкожно, интраназально, эпидурально, сублингвально, интрацеребрально, интравагинально, трансдермально, ректально, мукозально, путем ингаляции или местно в уши, нос, глаза или на кожу. Способ введения остается на усмотрение лечащего врача и будет зависеть, в частности, от медицинского состояния.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложены капсулы, содержащие аминопуриновое соединение без дополнительного наполнителя, эксципиента или носителя.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложены композиции, содержащие эффективное количество аминопуринового соединения и фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель, где фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель может включать эксципиент, разбавитель или их смесь. В одном из вариантов осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

Композиции могут быть в форме таблеток, жевательных таблеток, капсул, растворов, парентеральных растворов, пастилок, суппозитория и суспензий и тому подобного. Композиции могут быть приготовлены так, чтобы содержать суточную дозу или подходящую часть суточной дозы в единице дозирования, которая может представлять собой одну таблетку или капсулу или подходящий объем жидкости. В одном из вариантов осуществления растворы получают из водорастворимых солей, таких как гидрохлорид. В целом, все композиции получают в соответствии с известными способами в фармацевтической химии. Капсулы могут быть получены путем смешивания аминопуринового соединения с подходящим носителем или разбавителем и заполнения капсул надлежащим количеством смеси. Обычные носители и разбавители включают, но не ограничены перечисленным, инертные порошкообразные вещества, такие как крахмал многих различных видов, порошкообразная целлюлоза, особенно кристаллическая и микрокристаллическая целлюлоза, сахара, такие как фруктоза, маннит и сахароза, зерновая мука и подобные пищевые порошки.

Таблетки могут быть получены путем прямого прессования, путем влажного гранулирования или путем сухого гранулирования. Их составы обычно включают разбавители, связующие, скользящие вещества и разрыхлители, а также соединение. Типичные разбавители включают, например, различные виды крахмала, лактозу, маннит, каолин, фосфат или сульфат кальция, неорганические соли, такие как хлорид натрия, и сахарную пудру. Подходящими также являются порошкообразные производные целлюлозы. Типичными связующими для таблеток являются такие вещества, как крахмал, желатин и сахара, такие как лактоза, фруктоза, глюкоза и тому подобные. Удобны также природные и синтетические смолы, включая аравийскую камедь, альгинаты, метилцеллюлозу, поливинилпирролидин и тому подобное.

Полиэтиленгликоль, этилцеллюлоза и воски также могут служить связующими.

В препарате в форме таблетки также может быть необходимым использовать скользящее вещество для предотвращения налипания красителя на таблетки и пуансоны. Скользящее вещество может быть выбрано из таких скользких твердых веществ, как тальк, стеарат магния и кальция, стеариновая кислота и гидрированные растительные масла. Разрыхлители для таблеток представляют собой вещества, набухающие при смачивании, разбивая таблетку на части и высвобождая соединение. К ним относятся крахмалы, глины, целлюлозы, альгины и смолы. В частности, могут быть использованы, например, кукурузный и картофельный крахмалы, метилцеллюлоза, агар, бентонит, древесная целлюлоза, порошковая натуральная губка, катионообменные смолы, альгиновая кислота, гуаровая камедь, цитрусовая пульпа и карбоксиметилцеллюлоза, а также лаурилсульфат натрия. Таблетки могут быть покрыты сахаром в качестве вкусоароматического вещества и герметизирующего материала, или пленкообразующими защитными агентами для модификации свойств растворения таблетки. Композиции также могут быть приготовлены в виде жевательных таблеток, например, с использованием в составе таких веществ, как маннит.

В случае, когда желательным является введение аминопуринового соединения в виде суппозитория, могут быть использованы общепринятые основы. Какао-масло представляет собой традиционную основу для суппозитория, которая может быть модифицирована добавлением восков, чтобы немного поднять температуру ее плавления. Широко используются смешивающиеся с водой основы для суппозиториев, содержащие, в частности, полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами.

Действие аминопуринового соединения может быть отсрочено или пролонгировано при использовании надлежащего препарата. Например, может быть получен медленнорастворимый осадок аминопуринового соединения и включен в таблетку или капсулу, или использован в виде имплантируемого устройства с замедленным высвобождением. Эта техника также включает изготовление осадков, имеющих несколько различных скоростей растворения, и заполнение капсул смесью этих осадков. Таблетки или капсулы могут быть покрыты пленкой, препятствующей растворению в течение предсказуемого периода времени. Даже препараты для парентерального введения могут быть получены с длительным действием путем растворения или суспендирования аминопуринового соединения в масляных или эмульгированных носителях, позволяющих ему медленно диспергироваться в сыворотке.

Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не для ограничения. Соединения называются с использованием автоматического инструмента для создания имен в составе Chemdraw Ultra 9.0 (Cambridgesoft), который создает систематические названия для химических структур с поддержкой правил Кана-Ингольда-Прелога для стереохимии.

Клеточные анализы.

Мультиплексный анализ цитотоксичности. Клетки выращивали в RPMI 1640, 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки), 2 mM L-аланил-L-глутамин, 1 mM пирувата Na или в специальной среде в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Клетки высевали в 384-луночные планшеты и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Соединения добавляли через 24 ч после посева клеток. В это же время готовили необработанный планшет с клетками в нулевой момент времени. Через 72 ч после инкубационного периода клетки фиксировали и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами и ядерным красителем для визуализации ядер, апоптотических клеток и митотических клеток. Апоптотические клетки обнаруживали с помощью антитела против активной формы каспазы-3. Митотические клетки обнаруживали с помощью антитела против фосфогистона 3. Соединения серийно разводили в 3,16 раз и анализировали 10 концентраций с конечной анализируемой концентрацией 0,1% ДМСО, начиная с самой высокой анализируемой концентрации 10 мкМ. Автоматизированную флуоресцентную микроскопию проводили с использованием устройства для визуализации Molecular Devices ImageXpress Micro XL с высоким разрешением, а изображения получали с помощью объектива с 4-кратным увеличением.

Анализ данных.

Шестнадцатититбитные изображения в формате TIFF получали и анализировали с помощью программного обеспечения MetaXpress 5.1.0.41. Пролиферацию клеток измеряли по интенсивности сигнала введенного ядерного красителя. Данные анализа пролиферации клеток называются относительным количеством клеток. Для определения конечной точки пролиферации клеток данные анализа пролиферации клеток преобразуют в процент от контроля (ПОК), используя следующую формулу:

$$\text{ПОК} = \frac{\text{относительное количество клеток (лунки с соединением)}}{\text{относительное количество клеток (лунки с носителем)}} \times 100.$$

IC₅₀ относительного количества клеток представляет собой концентрацию исследуемого соединения при 50% от максимально возможного ответа по сравнению с контролем ДМСО. GI₅₀ представляет собой концентрацию, необходимую для уменьшения наблюдаемого роста вдвое. Она представляет собой концентрацию, ингибирующую рост до уровня, находящегося посередине между ростом в необработанных клетках и числом клеток, засеянных в лунку (значение нулевого времени). Значения IC₅₀ рассчитаны с помощью нелинейной регрессии для соответствия данных сигмоидальной односайтовой 4-точечной, 4-параметерной модели доза-ответ, где:

$$y \text{ (согласованный)} = A + \frac{(B-A)}{1 + ((C/x)^D)}$$

Активная форма каспазы-3 позволяет метить клетки от ранней до поздней стадии апоптоза. Концентрации исследуемого соединения, вызывающие 5-кратную индукцию сигнала каспазы-3 (Cal_X5), указывают на значительную индукцию апоптоза. Максимальная индукция каспазы-3 соединением по сравнению с контролем ДМСО указана как Max Fold Change.

Таблица 2. Линии клеток, использованные в мультиплексных анализах цитотоксичности

Линия клеток	Вид	Подвид
SW-13	Эндокринные	Надпочечников
NCI-H295R	Эндокринные	Надпочечников
639-V	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
BFTC-905	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
HT1376	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
SCaBER	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
T24	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
5637	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
647-V	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
HT-1197	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
TCCSUP	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
J82	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
UM-UC-3	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря
MDA-MB-436	Молочной железы	Молочной железы
Hs 578T	Молочной железы	Молочной железы
AU565	Молочной железы	Молочной железы
BT20	Молочной железы	Молочной железы
SK-BR-3	Молочной железы	Молочной железы
BT474	Молочной железы	Молочной железы
CAMA-1	Молочной железы	Молочной железы
EFM-19	Молочной железы	Молочной железы
KPL-1	Молочной железы	Молочной железы
MDA MB 231	Молочной железы	Молочной железы
MDA MB 453	Молочной железы	Молочной железы
MCF7	Молочной железы	Молочной железы
T47D	Молочной железы	Молочной железы
MDA-MB-415	Молочной железы	Молочной железы
ZR-75-1	Молочной железы	Молочной железы
BT-549	Молочной железы	Молочной железы
MDA MB 468	Молочной железы	Молочной железы
C-33A	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
C-4 I	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
C-4 II	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
HeLa	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
SiHa	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
DoTc2 4510	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
HT-3	Женской мочеполовой системы	Шейки матки
LS513	Толстой кишки	Толстой кишки

LS411N	Толстой кишки	Толстой кишки
SNU-C2B	Толстой кишки	Толстой кишки
LS123	Толстой кишки	Толстой кишки
MT-3	Толстой кишки	Толстой кишки
SW403	Толстой кишки	Толстой кишки
RKO-AS45-1	Толстой кишки	Толстой кишки
SW480	Толстой кишки	Толстой кишки
SW948	Толстой кишки	Толстой кишки
Colo 320 HSR	Толстой кишки	Толстой кишки
HCT-15	Толстой кишки	Толстой кишки
HCT-116	Толстой кишки	Толстой кишки
RKOE6	Толстой кишки	Толстой кишки
SW48	Толстой кишки	Толстой кишки
SW837	Толстой кишки	Толстой кишки
SW1463	Толстой кишки	Толстой кишки
Colo 320DM	Толстой кишки	Толстой кишки
HT-29	Толстой кишки	Толстой кишки
LS1034	Толстой кишки	Толстой кишки
Colo 201	Толстой кишки	Толстой кишки
Colo 205	Толстой кишки	Толстой кишки
NCI-H747	Толстой кишки	Толстой кишки
RKO	Толстой кишки	Толстой кишки
SW1417	Толстой кишки	Толстой кишки
DLD-1	Толстой кишки	Толстой кишки
NCI-H508	Толстой кишки	Толстой кишки
SW620	Толстой кишки	Толстой кишки
WiDr	Толстой кишки	Толстой кишки
HRT-18	Толстой кишки	Толстой кишки
LS-174T	Толстой кишки	Толстой кишки
HuTu 80	Двенадцатиперстной кишки	Двенадцатиперстной кишки
Y79	Глаза	Глаза
Hs 683	Центральной нервной системы	Глиома
U-118 MG	Центральной нервной системы	Глиома
M059J	Центральной нервной системы	Глиома
PFSK-1	Центральной нервной системы	Глиома
SW1783	Центральной нервной системы	Глиома
SW1088	Центральной нервной системы	Глиома

T98G	Центральной нервной системы	Глиома
CCF-STTG1	Центральной нервной системы	Глиома
A172	Центральной нервной системы	Глиома
DBTRG-05MG	Центральной нервной системы	Глиома
H4	Центральной нервной системы	Глиома
SNB-19	Центральной нервной системы	Глиома
U-138MG	Центральной нервной системы	Глиома
U-87 MG	Центральной нервной системы	Глиома
DK-MG	Центральной нервной системы	Глиома
A-253	Головы и шеи	Головы и шеи
A388	Головы и шеи	Головы и шеи
Detroit 562	Головы и шеи	Головы и шеи
A431	Головы и шеи	Головы и шеи
Cal 27	Головы и шеи	Головы и шеи
OE19	Головы и шеи	Головы и шеи
OE33	Головы и шеи	Головы и шеи
SCC-4	Головы и шеи	Головы и шеи
FaDu	Головы и шеи	Головы и шеи
OE21	Головы и шеи	Головы и шеи
SCC-25	Головы и шеи	Головы и шеи
SCC-9	Головы и шеи	Головы и шеи
A-704	Почки	Почки
769-P	Почки	Почки
786-O	Почки	Почки
G-402	Почки	Почки
ACHN	Почки	Почки
Caki-1	Почки	Почки
Caki-2	Почки	Почки
SK-NEP-1	Почки	Почки
G-401	Почки	Почки
A498	Почки	Почки
KG-1	Кроветворной системы	Лейкоз
RS4;11	Кроветворной системы	Лейкоз
KU812	Кроветворной системы	Лейкоз
TF-1	Кроветворной системы	Лейкоз
MX1	Кроветворной системы	Лейкоз
NALM-6	Кроветворной системы	Лейкоз

MOLT-3	Кроветворной системы	Лейкоз
MOLT-16	Кроветворной системы	Лейкоз
MEG01	Кроветворной системы	Лейкоз
MHN-PREB-1	Кроветворной системы	Лейкоз
MV-4-11	Кроветворной системы	Лейкоз
Thp1	Кроветворной системы	Лейкоз
BV-1/3	Кроветворной системы	Лейкоз
CCRFCEM	Кроветворной системы	Лейкоз
CML-T1	Кроветворной системы	Лейкоз
HEL-92-1-7	Кроветворной системы	Лейкоз
J-RT3-T3-5	Кроветворной системы	Лейкоз
Jurkat	Кроветворной системы	Лейкоз
CEM-C1	Кроветворной системы	Лейкоз
EM-2	Кроветворной системы	Лейкоз
K562	Кроветворной системы	Лейкоз
HuCC1	Печени	Печени
HLE	Печени	Печени
HUH-6 Clone 5	Печени	Печени
HepG2	Печени	Печени
HLF	Печени	Печени
OCUG-1	Печени	Печени
SNU-423	Печени	Печени
Hs 611.T	Кроветворной системы	Лимфома
EB2	Кроветворной системы	Лимфома
GA-10	Кроветворной системы	Лимфома
H9	Кроветворной системы	Лимфома
JeKo-1	Кроветворной системы	Лимфома
SU-DHL-8	Кроветворной системы	Лимфома
SUP-T1	Кроветворной системы	Лимфома
TUR	Кроветворной системы	Лимфома
Hs 445	Кроветворной системы	Лимфома
BSP-1	Кроветворной системы	Лимфома
CA46	Кроветворной системы	Лимфома
Jiyoye	Кроветворной системы	Лимфома
MC116	Кроветворной системы	Лимфома
NAMALWA	Кроветворной системы	Лимфома
REC-1	Кроветворной системы	Лимфома

SU-DHL-4	Кроветворной системы	Лимфома
SU-DHL-5	Кроветворной системы	Лимфома
SU-DHL-10	Кроветворной системы	Лимфома
DB	Кроветворной системы	Лимфома
DOHH-2	Кроветворной системы	Лимфома
HT	Кроветворной системы	Лимфома
RPMI 6666	Кроветворной системы	Лимфома
Raji	Кроветворной системы	Лимфома
SR	Кроветворной системы	Лимфома
ST486	Кроветворной системы	Лимфома
BC-1	Кроветворной системы	Лимфома
Daudi	Кроветворной системы	Лимфома
L-428	Кроветворной системы	Лимфома
EB-3	Кроветворной системы	Лимфома
Ramos (RA 1)	Кроветворной системы	Лимфома
CRO-AP2	Кроветворной системы	Лимфома
D341 Med	Центральной нервной системы	Медуллобластома
D283 Med	Центральной нервной системы	Медуллобластома
Daoy	Центральной нервной системы	Медуллобластома
Hs 852.T	Кожи (меланома)	Меланома
WM-266-4	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 934.T	Кожи (меланома)	Меланома
A2058	Кожи (меланома)	Меланома
G-361	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 688 (A) .T	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 936.T (C1)	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 895.T	Кожи (меланома)	Меланома
A7	Кожи (меланома)	Меланома
C32	Кожи (меланома)	Меланома
CHL-1	Кожи (меланома)	Меланома
SK-MEL-28	Кожи (меланома)	Меланома
SH-4	Кожи (меланома)	Меланома
RPMI-7951	Кожи (меланома)	Меланома
MALME3M	Кожи (меланома)	Меланома
MeWo	Кожи (меланома)	Меланома
SK-MEL-1	Кожи (меланома)	Меланома
SK-MEL-3	Кожи (меланома)	Меланома

C32TG	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 294T	Кожи (меланома)	Меланома
Hs 695T	Кожи (меланома)	Меланома
A101D	Кожи (меланома)	Меланома
A375	Кожи (меланома)	Меланома
COLO 829	Кожи (меланома)	Меланома
HMCB	Кожи (меланома)	Меланома
IM-9	Кроветворной системы	Миелома
SKO-007	Кроветворной системы	Миелома
U266B1	Кроветворной системы	Миелома
RPMI 8226	Кроветворной системы	Миелома
ARH-77	Кроветворной системы	Миелома
BE(2)C	Центральной нервной системы	Пейробластома
SK-N-FI	Центральной нервной системы	Нейробластома
SNP-212	Центральной нервной системы	Нейробластома
SK-N-AS	Центральной нервной системы	Нейробластома
MC-IXC	Центральной нервной системы	Нейробластома
SK-N-DZ	Центральной нервной системы	Нейробластома
Hs 229.T	Легкого	НМРЛ
NCI-H661	Легкого	НМРЛ
A427	Легкого	НМРЛ
Calu6	Легкого	НМРЛ
NCI-H460	Легкого	НМРЛ
NCI-H520	Легкого	НМРЛ
NCI-H596	Легкого	НМРЛ
NCIH441	Легкого	НМРЛ
A549	Легкого	НМРЛ
ChaGoK1	Легкого	НМРЛ
Calu1	Легкого	НМРЛ
COR-L23	Легкого	НМРЛ
SKMES1	Легкого	НМРЛ
NCI-H292	Легкого	НМРЛ
COR-L105	Легкого	НМРЛ
G-292, clone A141B1	Мягких тканей	Остеосаркома
Hs 888.Sk	Мягких тканей	Остеосаркома
HOS	Мягких тканей	Остеосаркома

MG-63	Мягких тканей	Остеосаркома
SJSA1	Мягких тканей	Остеосаркома
SW1353	Мягких тканей	Остеосаркома
SaOS2	Мягких тканей	Остеосаркома
U2OS	Мягких тканей	Остеосаркома
KHOS-240S	Мягких тканей	Остеосаркома
ME-180	Женской мочеполовой системы	Яичника
PA-1	Женской мочеполовой системы	Яичника
Ca Ski	Женской мочеполовой системы	Яичника
MS751	Женской мочеполовой системы	Яичника
CaOV3	Женской мочеполовой системы	Яичника
OVCAR3	Женской мочеполовой системы	Яичника
SKOV3	Женской мочеполовой системы	Яичника
PSN-1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
AsPC-1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
PANC-1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
Hs 766T	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
Mia PaCa-2	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
SU.86.86	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
YAPC	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
BxPC-3	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
CFPAC-1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
Capan-1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
Capan-2	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
HPAF-II	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
HuP-T4	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы
BeWo	Плаценты	Плаценты
JAR	Плаценты	Плаценты
JEG-3	Плаценты	Плаценты
22Rv1	Предстательной железы	Предстательной железы
DU145	Предстательной железы	Предстательной железы
PC-3	Предстательной железы	Предстательной железы
LNCaP	Предстательной железы	Предстательной железы
BM-1604	Предстательной железы	Предстательной железы
VRH1	Предстательной железы	Предстательной железы
Hs 729	Мягких тканей	Саркома
VA-ES-BJ	Мягких тканей	Саркома

Hs 821.T	Мягких тканей	Саркома
TE 125.T	Мягких тканей	Саркома
RD	Мягких тканей	Саркома
SK-UT-1	Мягких тканей	Саркома
A-673	Мягких тканей	Саркома
SW684	Мягких тканей	Саркома
A204	Мягких тканей	Саркома
SW872	Мягких тканей	Саркома
SW982	Мягких тканей	Саркома
HT-1080	Мягких тканей	Саркома
MES-SA	Мягких тканей	Саркома
SJRH30	Мягких тканей	Саркома
SK-LMS-1	Мягких тканей	Саркома
TE 381.T	Мягких тканей	Саркома
NCI-H510A	Легкого	МРЛ
NCIH446	Легкого	МРЛ
SHP-77	Легкого	МРЛ
DMS114	Легкого	МРЛ
SW900	Легкого	МРЛ
DMS53	Легкого	МРЛ
NCI-H69	Легкого	МРЛ
DMS273	Легкого	МРЛ
SK-PN-DW	Желудка	Желудка
AGS	Желудка	Желудка
HS 746T	Желудка	Желудка
SNU-1	Желудка	Желудка
KATO III	Желудка	Желудка
SNU-16	Желудка	Желудка
SNU-5	Желудка	Желудка
NTERA-2 cl.D1	Яичка	Яичка
TT	Эндокринные	Щитовидной железы
BHT-101	Эндокринные	Щитовидной железы
CAL-62	Эндокринные	Щитовидной железы
CGTH-W-1	Эндокринные	Щитовидной железы
SW579	Эндокринные	Щитовидной железы
HEC-1-A	Женской мочеполовой системы	Матки
RL95-2	Женской мочеполовой системы	Матки
KLE	Женской мочеполовой системы	Матки
AN3 CA	Женской мочеполовой системы	Матки
SW962	Женской мочеполовой системы	Вульвы
SW954	Женской мочеполовой системы	Вульвы

Показано, или будет показано в дальнейшем, что аминокриновые соединения (на примере соединения 1) демонстрируют антипролиферативную активность в различных линиях раковых клеток. Антипролиферативная активность в этих линиях раковых клеток указывает на то, что аминокриновые соединения могут быть пригодны для лечения рака, включая солидные опухоли, как показано на примере меланомы, колоректального рака, рака желудка, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака мочевого пузыря, рака ЦНС, рака легкого, рака поджелудочной железы и рака мягких тканей.

В другом варианте осуществления показано, или будет показано в дальнейшем, что аминокриновые соединения (на примере соединения 1) индуцируют апоптоз в различных линиях раковых клеток.

Индукция апоптоза указывает на то, что аминопуриновые соединения могут быть пригодны для лечения раковых заболеваний, включая солидные опухоли, как показано на примере рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (включая нейробластома и глиому), рака толстой кишки, рака желудочно-кишечного тракта (например, рака желудка или рака толстой кишки), эндокринного рака (например, рака щитовидной железы или рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака шейки матки или светлоклеточного рака яичника, рака вульвы, рака матки или рака яичника), рака головы и шеи, рака кроветворной системы (например, лейкоза или миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ или МРЛ), меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы или рака мягких тканей (например, саркомы или остеосаркомы).

В другом варианте осуществления показано, или будет показано в дальнейшем, что аминопуриновые соединения (на примере соединения 1) вызывают остановку в точке G1/S в различных линиях раковых клеток. Причинение остановки в точке G1/S в этих линиях раковых клеток указывает на то, что аминопуриновые соединения могут быть пригодны для лечения раковых заболеваний, включая солидные опухоли, как показано на примере рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ЦНС (например, глиомы или нейробластома), рака толстой кишки, рака желудочно-кишечного тракта (например, рака желудка), эндокринного рака (например, рака щитовидной железы или рака надпочечников), рака женской мочеполовой системы (например, рака шейки матки, светлоклеточного рака яичника или рака вульвы), рака головы и шеи, рака кроветворной системы (например, лейкоза или миеломы), рака почки, рака печени, рака легкого (например, НМРЛ или МРЛ), меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы или рака мягких тканей (саркомы или остеосаркомы).

Мультиплексный анализ цитотоксичности. В другом эксперименте клетки выращивали в RPMI 1640, 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки), 2 mM L-аланил-L-глутамин, 1 mM пирувата Na или в специальной среде в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Клетки высевали в 384-луночные планшеты и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Соединения добавляли через 24 ч после посева клеток. В это же время готовили необработанный планшет с клетками в нулевой момент времени. Через 72 ч после инкубационного периода клетки фиксировали и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами и ядерным красителем для визуализации ядер, апоптотических клеток и митотических клеток. Апоптотические клетки обнаруживали с помощью антитела против активной формы каспазы-3. Митотические клетки обнаруживали с помощью антитела против фосфо-гистона 3. Соединения серийно разводили в 3,16 раз и анализировали 10 концентраций с конечной анализируемой концентрацией 0,1% ДМСО, начиная с самой высокой анализируемой концентрации 10 мкМ. Автоматизированную флуоресцентную микроскопию проводили с использованием устройства для визуализации Molecular Devices ImageXpress Micro XL с высоким разрешением, а изображения получали с помощью объектива с 4-кратным увеличением.

Анализ данных. Шестнадцатититные изображения в формате TIFF получали и анализировали с помощью программного обеспечения MetaXpress 5.1.0.41. Клеточную пролиферацию измеряли по интенсивности сигнала введенного ядерного красителя. Данные анализа пролиферации клеток называли относительным количеством клеток. Для определения конечной точки пролиферации клеток данных анализа пролиферации клеток преобразовывали в процент от контроля (ПОК), используя следующую формулу:

$$\text{ПОК} = \frac{\text{относительное количество клеток (лунки с соединением)}}{\text{относительное количество клеток (лунки с носителем)}} \times 100.$$

IC₅₀ относительного количества клеток представляет собой концентрацию исследуемого соединения при 50% от максимально возможного ответа по сравнению с контролем ДМСО. GI₅₀ представляет собой концентрацию, необходимую для уменьшения наблюдаемого роста вдвое. Она соответствует концентрации, ингибирующей рост до уровня, находящегося посередине между ростом в необработанных клетках и числом клеток, засеянных в лунку (значение нулевого времени). Значения IC₅₀ рассчитаны с помощью нелинейной регрессии для соответствия данных сигмоидальной односайтовой 4-точечной, 4-параметерной модели доза-ответ, где:

$$y \text{ (согласованный)} = A + \frac{(B-A)}{1 + ((C/x)^D)}$$

Активная форма каспазы-3 позволяет метить клетки от ранней до поздней стадии апоптоза. Концентрации исследуемого соединения, вызывающие 2-кратную (Cal-X2) или 5-кратную индукцию сигнала каспазы-3 (Cal_X5), указывали на значительную индукцию апоптоза. Максимальная индукция каспазы-3 соединением по сравнению с контролем ДМСО указана как Max Fold Change.

Таблица 3. Результаты анализов цитотоксичности

Линия клеток	Вид опухоли	Подвид	GI50 (мкМ)	IC50 (мкМ)	CalX 2 (мкМ)	Cal X5 (мкМ)	Max fold change
NCIH295R	Эндокринные	Надпочечников	10	10	10	10	1,74
SW13	Эндокринные	Надпочечников	0,07	0,135	0,04	0,5	8,74
			11			35	
5637	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	6,85	9,77	10	10	2,12
639V	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,184	0,206	0,0841	0,465	6,33
647V	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	6,93	7,82	2,7413	4,45	19,29
BFTC905	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,0515	0,0546	0,0179	0,0414	45,3
HT1197	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,444	10	0,1601	10	4,16
HT1376	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,792	3,48	0,0524	0,167	10,87
J82	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	10	10	2,4365	10	3,17
SCABER	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,0665	0,0772	0,0086	0,0506	29,47
T24	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,233	0,274	4,5443	10	2,61
TCCSUP	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	2,21	6,59	5,6435	10	3,67
UMUC3	Мочевого пузыря	Мочевого пузыря	0,149	0,201	2,7934	5,76	6,56
AU565	Молочной железы	Молочной железы	8,15	8,77	3,8749	7,14	14,18
BT20	Молочной железы	Молочной железы	8,36	10	10	10	1,81
BT474	Молочной железы	Молочной железы	10	10	10	10	0,94
BT549	Молочной железы	Молочной железы	10	10	5,4537	10	3,14
СAМА1	Молочной железы	Молочной железы	0,298	2,24	6,4981	10	2,85
EFM19	Молочной железы	Молочной железы	4,2	10	10	10	2,1
HS578T	Молочной	Молочной	0,15	0,837	2,67	6,5	5,94

	железы	железы	3		23	8	
KPL1	Молочной железы	Молочной железы	10	10	0,04 81	10	2,63
MCF7	Молочной железы	Молочной железы	0,63 6	3,47	6,55 92	9,7 4	5,78
MDAMB23 1	Молочной железы	Молочной железы	0,03 39	0,062 4	0,02 42	0,2 57	5,94
MDAMB41 5	Молочной железы	Молочной железы	0,72 9	10	10	10	1,85
MDAMB43 6	Молочной железы	Молочной железы	0,26 2	10	5,11 8	10	4,25
MDAMB45 3	Молочной железы	Молочной железы	0,65 6	2,82	10	10	1,07
MDAMB46 8	Молочной железы	Молочной железы	0,03 63	0,072 1	0,09 69	10	3,81
MT3	Молочной железы	Молочной железы	0,67 4	1,08	7,65 44	10	2,81
SKBR3	Молочной железы	Молочной железы	6,81	8,45	3,22 11	6,2	12,7 9
T47D	Молочной железы	Молочной железы	10	10	10	10	2
ZR751	Молочной железы	Молочной железы	0,09 43	7,7	5,90 55	6,4 4	7,36
A431	Кожи	Карцинома	0,22 8	0,311	0,08 01	1,7 6	5,11
C33A	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	0,19 1	0,407	3,67 98	5,3 9	9,45
C4I	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	10	10	5,71 77	7,9 4	7,38
C4II	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	10	10	0,04 4	10	3,7
DOTC245 10	Женской мочеполовой	Шейки матки	0,04	0,132	0,02 68	10	5,03

	системы						
HELA	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	6,75	8,71	7,07 94	10	3,65
HT3	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	0,85 6	3,21	0,29 06	3,7 4	7,49
SINA	Женской мочеполовой системы	Шейки матки	10	10	7,68 82	8,8 2	5,49
COLO201	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 28	0,017 2	0,02 25	0,2 67	6,09
COLO205	Толстой кишки	Толстой кишки	0,00 95	0,011 7	0,01 02	0,0 248	9,86
COLO320 DM	Толстой кишки	Толстой кишки	9,11	10	6,18 62	9,5 3	5,28
COLO320 HSR	Толстой кишки	Толстой кишки	4,19	4,44	2,01 86	3,5 3	49,7 3
DL1	Толстой кишки	Толстой кишки	0,16 2	0,197	0,04 74	0,1 04	21,9 5
HCT116	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 94	0,020 4	0,01 96	0,0 448	45,4 3
HCT15	Толстой кишки	Толстой кишки	1,97	2,23	5,12 11	7,0 3	7,97
HRT18	Толстой кишки	Толстой кишки	0,07 75	0,081 9	0,06 57	0,1 47	11,1
HT29	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 29	0,016 7	0,00 92	0,0 318	61,5 9
LS1034	Толстой кишки	Толстой кишки	0,22 4	0,676	1,47 81	10	2,52
LS123	Толстой кишки	Толстой кишки	0,06 1	0,188	0,07 66	10	4,74
LS174T	Толстой кишки	Толстой кишки	0,19 4	0,259	0,28 46	0,4 12	5,63
LS411N	Толстой кишки	Толстой кишки	0,03 58	0,053	0,05 75	10	5,58

LS513	Толстой кишки	Толстой кишки	0,03 53	0,038 6	0,02 33	0,0 356	64,3 1
NCIH508	Толстой кишки	Толстой кишки	0,02 88	0,048 1	0,07 78	1,2 5	5,37
NCIH747	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 2	0,044 5	0,02 26	0,0 756	8,21
RKO	Толстой кишки	Толстой кишки	0,03 53	0,040 5	0,04 07	0,3 78	11,1 4
RKOAS45 1	Толстой кишки	Толстой кишки	0,04 05	0,044 9	0,18 73	1,1 6	10,0 6
RKOE6	Толстой кишки	Толстой кишки	0,07 53	0,107	1,69 88	3,6	29,2 6
SNUC2B	Толстой кишки	Толстой кишки	0,05 44	0,722	10	10	1,67
SW1417	Толстой кишки	Толстой кишки	0,00 88	0,035 1	0,02 21	0,0 693	6,76
SW1463	Толстой кишки	Толстой кишки	0,13 5	0,181	2,41 38	10	2,82
SW403	Толстой кишки	Толстой кишки	0,04 76	0,173	0,10 84	10	4,02
SW48	Толстой кишки	Толстой кишки	0,00 18	0,003 1	0,00 47	0,0 266	13,6 6
SW480	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 84	0,031 1	0,06 38	0,2 48	6,26
SW620	Толстой кишки	Толстой кишки	0,04 92	0,079 8	1,47 74	3,8 8	14,6 6
SW837	Толстой кишки	Толстой кишки	0,17 2	0,348	0,32 5	10	4,34
SW948	Толстой кишки	Толстой кишки	0,19 5	0,327	10	10	1,57
WIDR	Толстой кишки	Толстой кишки	0,01 04	0,013 3	0,00 85	0,0 21	79,0 3
HUTU80	Двенадцатиперстной кишки	Двенадцатиперстной кишки	0,05 7	0,069 5	0,01 61	0,3 54	9,27
Y79	Глаза - ретинобласто	Глаза	10	10	7,87 39	10	2,58

039392

	ма						
A172	ЦНС	Глиома	0,06 49	0,139	0,11 74	2,3 6	5,95
CCFSTTG 1	ЦНС	Глиома	10	10	10	10	1,03
DBTRG05 MG	ЦНС	Глиома	0,04 32	0,098 4	0,19 63	10	3,94
DKMG	ЦНС	Глиома	0,02 07	0,126	0,04 63	0,1 6	10,8 6
H4	ЦНС	Глиома	0,75 8	0,943	1,72 85	3,7 8	14,4 7
HS683	ЦНС	Глиома	0,14 8	0,305	10	10	2,54
M059J	ЦНС	Глиома	0,61 2	3,31	4,96 33	10	2,8
PFSK1	ЦНС	Глиома	0,02 34	10	10	10	1,06
SNB19	ЦНС	Глиома	0,16 3	0,244	0,44 78	10	3,29
SW1088	ЦНС	Глиома	3,35	5,98	5,26 15	7,5	9,59
SW1783	ЦНС	Глиома	5,92	9,85	9,09 94	10	2,49
T98G	ЦНС	Глиома	10	10	5,42 25	10	3,16
U118MG	ЦНС	Глиома	0,17 5	10	10	10	1,92
U138MG	ЦНС	Глиома	0,05 3	10	0,15 98	0,4 17	8,01
U87MG	ЦНС	Глиома	0,06 92	0,101	9,36 15	10	2,14
A253	Головы и шеи	Головы и шеи	0,17 1	10	8,78 11	10	2,85
A388	Головы и шеи	Головы и шеи	0,42 2	1,12	0,09 02	3,5 2	6,48
CAL27	Головы и шеи	Головы и шеи	0,05	0,066	0,08	0,4	7,98

			92	1	77	6	
DETROIT 562	Головы и шеи	Головы и шеи	0,34 7	10	4,94 84	7,1 6	6,02
FADU	Головы и шеи	Головы и шеи	0,43 5	0,787	4,06 08	5,6 4	8,64
SCC25	Головы и шеи	Головы и шеи	0,04 39	0,051	0,11 87	0,3 04	6,72
SCC4	Головы и шеи	Головы и шеи	0,05 12	0,108	0,03 17	0,0 65	7,38
SCC9	Головы и шеи	Головы и шеи	0,11 7	0,28	0,66 79	3,8 6	9,58
769P	Почки	Почки	0,19 4	0,255	0,20 23	5,1 1	5,67
7860	Почки	Почки	2,04	6,92	10	10	0,83
A498	Почки	Почки	0,52 2	0,808	0,55 62	10	4,72
A704	Почки	Почки	10	10	10	10	0,96
ACHN	Почки	Почки	0,30 6	0,55	0,78	10	2,97
CAKI1	Почки	Почки	0,09 14	0,151	0,20 15	10	4,12
CAKI2	Почки	Почки	0,13 9	0,193	0,16 31	0,4 49	6,26
G401	Почки	Почки	0,07 74	0,086	0,07 17	0,1 79	30,8 7
G402	Почки	Почки	0,05 04	0,092 5	0,01 62	0,6 37	7,34
SKNEP1	Почки	Почки	10	10	10	10	1,15
BV173	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	1,1	10	0,49 59	10	2,91
CCRFCEM	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	5,03	6,05	3,42 79	6,9 5	12,7 4
CEMC1	Кроветворной системы и	Лейкоз	10	10	4,18 28	5,2 2	11,2 7

	лимфоидная						
CMLT1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,14 9	10	0,09 48	10	4,85
EM2	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,04 81	0,093 6	10	10	1,55
HEL9217	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	4,62	8,23	3,29 91	6,5 7	6,23
JRT3T35	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	3,58	4,78	2,63 64	3,8	14,2 6
JURKAT	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	3,34	3,73	1,61 73	3,2 8	14,4 8
K562	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	10	10	2,92 98	4,8 6	51,8 9
KG1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,00 17	0,032 5	2,58 11	10	2,5
KU812	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,00 3	0,015 9	0,03	8,0 2	5,63
MEG01	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,08 18	0,221	0,57 18	10	2,77
MNHPREV 1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	6,69	6,97	5,11 42	7,6 6	11,4 3
MOLT16	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	2,88	3,35	2,41 02	4,9 7	8,06
MOLT3	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,94 6	3,03	5,88	10	3,63

MV411	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,10 7	0,184	0,09 33	1,1 5	8,12
MX1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,04 01	0,061 9	1,10 16	10	3,78
NALM6	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	10	10	0,12 41	10	5
RS411	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,35 9	2,96	3,80 25	8,4	5,83
TF1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,00 15	0,009 5	0,00 6	0,0 296	16,1
THP1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лейкоз	0,02 51	0,049 5	0,13 2	3,9	6,3
HEPG2	Печени	Печени	0,02 24	0,064 3	0,00 41	0,0 108	62,4 7
HLE	Печени	Печени	0,68 3	1,04	0,81 74	10	2,5
HLF	Печени	Печени	4,76	6,47	10	10	1,95
HUCST1	Печени	Печени	0,05 37	0,063 3	0,02 22	0,0 406	11,5 4
HUN6CLO NE5	Печени	Печени	0,14 5	0,354	0,06 31	0,3 02	8,25
OCUG1	Печени	Печени	0,46 4	1,29	0,08 48	0,4 9	5,49
SNU423	Печени	Печени	0,19 2	0,276	0,09 09	1,6 5	7,32
BC1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	10	10	5,10 05	6,5 4	8,72
BCP1	Кроветворной системы и	Лимфома	0,02 05	0,079 7	4,86 63	7,3 6	6,56

	лимфоидная						
CA46	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 46	0,021 3	3,23 95	8,0 8	9,46
CROAP2	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,99 6	2,58	2,96 03	4,2	50,7 9
DAUDI	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 77	10	3,93 92	5,3 3	10,0 8
DB	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 31	10	6,11 53	6,5	7,11
DONN2	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	5,54	5,79	2,48 33	3,9 9	20,4 1
EB2	Нематopoietic and lymphoid	Лимфома	0,38 9	0,55	5,73 81	10	4,16
EB3	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	1,63	2,15	6,14 69	7,6 6	5,5
GA10	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,04 68	0,056 7	0,64 77	1,9 4	6,49
H9	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,02 32	0,039	0,02 22	0,4	7,33
HS445	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 43	0,037 7	4,91 28	7,7	5,65
HS611T	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 06	0,012 3	2,85 07	10	3,84
HT	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	8,3	10	8,63 54	10	2,44

JEK01	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,46 1	0,83	4,33 69	10	3,11
JIIYOYE	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,08 14	0,21	4,40 04	5,3 5	11,1
L428	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	1,63	3,46	4,23 84	5,8 8	7,51
MC116	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	6,02	6,49	2,87 63	5,1 8	9,46
NAMALWA	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 81	0,023 9	5,94 31	10	2,68
RAJI	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,17 9	10	2,55 64	4,0 7	24,8 1
RAMOSRA 1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	3,66	3,84	4,54 96	7,3 9	25,1
REC1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,00 53	0,193	10	10	1,86
REMI666 6	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,08 01	0,37	3,04 19	4,3 7	26,3 5
SR	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	1,42	1,84	1,28 42	3,0 7	33,5 2
ST486	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	5,02	6,14	4,24 22	6,1 1	10,8 5
SUDHL10	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	1,23	1,4	3,61 1	4,8 7	11,6 3
SUDHL4	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,16	0,332	2,56	4,8	10,7

	системы и лимфоидная		8		68	3	5
SUDHL5	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,00 11	0,001 3	1,63 59	4,5 4	10,3 7
SUDHL8	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 93	0,040 6	1,23 44	4,1 9	10,7 9
SUPT1	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,01 96	0,046 6	4,54 76	9,2 1	5,76
TUR	Кроветворной системы и лимфоидная	Лимфома	0,04 15	0,053 9	0,69 84	3,4 5	17,3 5
D283MED	ЦНС	Медуллобластома	2,56	7,55	8,34 56	10	2,23
D341MED	ЦНС	Медуллобластома	10	0,021 9	7,78 55	10	2,14
DAOY	ЦНС	Медуллобластома	0,74 9	1,09	3,27 73	5,2 2	16,6 8
A101D	Кожи	Меланома	0,04 24	0,081 5	0,42 07	3,7 1	7,93
A2058	Кожи	Меланома	0,21 2	0,288	0,06 5	0,2 04	11,6 8
A375	Кожи	Меланома	0,00 65	0,007 2	0,06 73	0,0 827	103, 79
A7	Кожи	Меланома	1,72	7,27	5,08 14	9,4	5,51
C32	Кожи	Меланома	0,02 89	0,111	0,04 51	0,0 778	110, 9
C32TG	Кожи	Меланома	0,04 08	0,109	0,06 08	0,1 17	42,8 2
CHL1	Кожи	Меланома	0,10 3	0,117	1,23 76	10	3,46
COLO829	Кожи	Меланома	0,01 21	0,034 3	0,04 21	0,1 25	24,2 8

G361	Кожи	Меланома	0,10 2	0,15	0,04 28	0,1 2	24,4 8
HMCB	Кожи	Меланома	0,07 24	0,113	10	10	1,8
HS294T	Кожи	Меланома	0,05 07	0,070 6	0,15 4	2,1 5	5,74
HS688AT	Кожи	Меланома	0,08 22	10	10	10	1,61
HS695T	Кожи	Меланома	0,03 63	0,16	0,02 53	0,0 727	22,0 5
HS852T	Кожи	Меланома	0,05 64	0,715	0,05	0,2 34	6,51
HS895T	Кожи	Меланома	10	10	10	10	1,52
HS934T	Кожи	Меланома	0,00 52	10	0,36 38	1,4	5,1
HS936TC 1	Кожи	Меланома	0,01 84	0,025 8	0,00 84	0,0 224	134, 98
MALME3M	Кожи	Меланома	0,00 34	0,012	0,00 25	0,0 045	102, 73
MEWO	Кожи	Меланома	0,10 2	0,159	0,16 7	0,3 73	14,3 4
RPMI795 1	Кожи	Меланома	0,07 16	0,094 5	0,12 37	1,2 9	28,1 5
SH4	Кожи	Меланома	0,02 08	0,029	0,01 57	0,0 382	66,4 4
SKMEL1	Кожи	Меланома	0,00 1	0,029 1	0,10 19	0,1 94	7,63
SKMEL28	Кожи	Меланома	0,02 79	0,057 1	0,29 07	0,3 44	16,6 4
SKMEL3	Кожи	Меланома	0,02 84	0,062 5	10	10	1,74
WM2664	Кожи	Меланома	0,01 2	0,035 4	0,00 23	0,0 151	83,2 9
ARH77	Кроветворной системы и лимфоидная	Миелома	10	10	10	10	1,86

IM9	Кроветворной системы и лимфоидная	Миелома	0,09 11	0,143	0,04 3	10	4,85
RPMI822 6	Кроветворной системы и лимфоидная	Миелома	1,09	2,48	3,31 03	5,3 4	8,35
SKO007	Кроветворной системы и лимфоидная	Миелома	0,02 74	0,482	0,17 58	2,7 9	7,24
U266B1	Кроветворной системы и лимфоидная	Миелома	0,01 33	0,109	0,04 93	10	4,36
BE2C	ЦНС	Нейробластома	0,14 6	0,21	0,12 23	10	5,47
CHP212	ЦНС	Нейробластома	0,00 66	0,016 5	0,01 9	0,3 41	5,97
MCIXC	ЦНС	Нейробластома	2,04	2,33	1,93 09	4,6 2	5,15
SKNAS	ЦНС	Нейробластома	0,04 89	0,132	0,06 75	0,2 27	8,86
SKNDZ	ЦНС	Нейробластома	7,4	10	10	10	1,23
SKNFI	ЦНС	Нейробластома	0,01 51	0,135	0,08 97	10	3,51
A427	Легкого	НМРЛ	0,04 75	0,076 3	0,00 18	10	3,34
A549	Легкого	НМРЛ	0,10 2	0,128	0,02 97	0,0 946	13,0 3
CALU1	Легкого	НМРЛ	0,09 67	0,149	0,25 75	10	3,73
CALU6	Легкого	НМРЛ	0,04 63	0,083	0,11	10	4,86
CHAGOK1	Легкого	НМРЛ	10	10	10	10	1,23
CORL105	Легкого	НМРЛ	0,01 65	0,041 4	0,05 83	0,5 71	6,55
CORL23	Легкого	НМРЛ	0,02 38	0,028 3	0,01 76	0,0 569	12,9 6

HS229T	Легкого	НМРЛ	0,41 5	10	0,84 48	7,2 2	5,29
NCIH292	Легкого	НМРЛ	0,27 8	0,686	2,46 02	4,8 5	10,2 6
NCIH441	Легкого	НМРЛ	0,27 1	1,25	7,74 06	10	4,32
NCIH460	Легкого	НМРЛ	10	10	10	10	0,98
NCIH520	Легкого	НМРЛ	0,99 1	2,13	3,63 7	5,0 3	13,9 5
NCIH596	Легкого	НМРЛ	2,75	10	10	10	1,11
NCIH661	Легкого	НМРЛ	1,44	2,64	0,08 33	10	4,58
SKMES1	Легкого	НМРЛ	0,10 3	0,122	0,03 84	0,2 12	27,0 3
OE19	Головы и шеи	Пищевода	0,34	10	10	10	1,79
OE21	Головы и шеи	Пищевода	0,09 39	0,124	0,02 21	0,9 48	5,91
OE33	Головы и шеи	Пищевода	0,06 3	0,096 9	0,03 17	0,4 95	5,9
G292CLO NEA141B 1	Мягких тканей	Остеосаркома	0,02 72	0,049 3	0,04 01	0,2 11	7,61
HOS	Мягких тканей	Остеосаркома	2,57	3,69	6,23 24	8,8 1	7,12
HS888SK	Мягких тканей	Остеосаркома	0,11 1	10	0,10 23	0,1 75	15,7
KHOS240 S	Мягких тканей	Остеосаркома	10	10	4,37 97	4,9 3	18,1 6
MG63	Мягких тканей	Остеосаркома	0,10 8	0,115	4,16 26	5,7 1	17,2 1
SAOS2	Мягких тканей	Остеосаркома	3,57	6,88	3,23 86	5,9 8	6,35
SJSA1	Мягких тканей	Остеосаркома	1,16	2,46	2,97 44	6,2 1	62,6 5
SW1353	Мягких тканей	Остеосаркома	0,18 4	0,292	0,40 4	10	4,79

U2OS	Мягких тканей	Остеосаркома	0,23	0,373	0,03 32	0,0 801	20,5 7
CAOV3	Женской мочеполовой системы	Яичника	0,42 9	10	2,00 76	10	2,95
CASKI	Женской мочеполовой системы	Яичника	6,76	10	0,97 19	10	2,61
ME180	Женской мочеполовой системы	Яичника	10	10	5,16 74	6,3 2	12,1 9
MS751	Женской мочеполовой системы	Яичника	6,91	9,51	5,43 63	10	3,62
OVCAR3	Женской мочеполовой системы	Яичника	10	10	10	10	1,19
PA1	Женской мочеполовой системы	Яичника	0,47 1	2,62	3,65 47	5,1	11,5 5
SKOV3	Женской мочеполовой системы	Яичника	0,54 7	10	0,29 39	10	2,65
ASPC1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	0,03 08	10	0,04 71	10	4,08
BXPC3	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	0,03 69	0,045 5	0,02 5	10	4,98
CAPAN1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	0,10 5	10	10	10	1,97
CAPAN2	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	0,13 6	0,291	10	0,2 09	6,62
CFPAC1	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	10	10	10	10	1,46
HPAFII	Поджелудочной железы	Поджелудочной железы	0,01 3	0,017 5	0,00 34	0,0 093	52,7 7
HS766T	Поджелудочно	Поджелудочной	0,03	0,079	0,06	0,6	6,36

	й железы	железы	43	3	46	32	
HUPT4	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,04 34	0,050 5	0,09 98	10	5,3
MIAPACA 2	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,03 57	0,039 6	0,03 87	0,5 78	15,1 6
PANC1	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,04 16	0,08	0,02 27	0,1 73	10,7 6
PSN1	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,00 83	0,009 2	0,03 6	0,0 701	8,75
SU8686	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,06 35	0,132	10	10	2,09
YAPC	Поджелудочно й железы	Поджелудочной железы	0,18 3	0,67	10	10	1,59
BEWO	Женской мочеполовой системы	Плаценты	5,16	5,69	3,97 78	6,4 2	10,1
JAR	Женской мочеполовой системы	Плаценты	3,17	3,21	1,00 62	2,9 9	102, 66
JEG3	Женской мочеполовой системы	Плаценты	6,34	7,75	5,88 23	7,9 5	6,39
22RV1	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	2,66	5,58	3,02 83	4,4 5	18,6 9
BM1604	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	0,14 1	0,401	10	10	1,8
VRH1	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	0,05 78	0,067 5	0,05 77	0,1 16	35,0 9
DU145	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	0,07 38	0,096 5	5,12 33	8,3 7	6,15
LNCAP	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	2,43	5,07	4,18 07	10	3,85
PC3	Предстательн ой железы	Предстательно й железы	7,82	8,54	10	10	3,64
A204	Мягких тканей	Саркома	10	10	0,29 06	10	3,48

A673	Мягких тканей	Саркома	3,75	3,87	3,41 1	4,5 9	27,7 8
HS729	Мягких тканей	Саркома	0,54	10	10	10	1,87
HS821T	Мягких тканей	Саркома	0,16 9	10	10	10	1,53
HT1080	Мягких тканей	Саркома	0,06 48	0,072 7	0,05 09	0,1 07	63,6 3
MESSA	Мягких тканей	Саркома	0,81	1,1	4,19 6	5,4 7	8,03
RD	Мягких тканей	Саркома	0,03 67	0,044 3	0,02 97	0,0 581	14,8 6
SJRH30	Мягких тканей	Саркома	0,21 9	1,47	0,03 9	10	5,61
SKLMS1	Мягких тканей	Саркома	0,14 6	0,166	0,14 05	0,8 76	12,5
SKUT1	Мягких тканей	Саркома	10	10	6,53 45	10	4,63
SW684	Мягких тканей	Саркома	0,08 69	0,37	0,25 6	0,3 08	16,8 8
SW872	Мягких тканей	Саркома	0,10 5	0,136	0,05 38	0,4 34	9,48
SW982	Мягких тканей	Саркома	0,01 56	0,061 4	10	10	1,94
TE125T	Мягких тканей	Саркома	1,09	10	3,96 73	10	2,5
TE381T	Мягких тканей	Саркома	0,00 76	0,012 8	0,00 48	0,0 143	15,8 8
VAESBJ	Мягких тканей	Саркома	0,33 6	0,58	3,17 52	10	3,26
DMS114	Легкого	МРЛ	0,06 88	0,6	0,91 42	10	3,38
DMS273	Легкого	МРЛ	5,96	6,79	6,56 76	8,5 3	6,76
DMS53	Легкого	МРЛ	0,99 8	10	0,06 61	1,4	7,01

NCIH446	Легкого	МРЛ	0,32 7	10	10	10	1,63
NCIH510 A	Легкого	МРЛ	3,7	6,61	3,85 17	8,6 2	6,44
NCIH69	Легкого	МРЛ	5	10	10	10	1,7
SHP77	Легкого	МРЛ	4,79	5,82	6,85 91	10	3,64
SW900	Легкого	МРЛ	0,02 16	0,039 9	0,01 62	0,0 849	10,2 6
AGS	Желудка	Желудка	0,00 86	0,009 8	0,00 75	0,0 131	31,1 2
HS746T	Желудка	Желудка	0,03 96	0,122	0,04 71	10	4,41
KATOIII	Желудка	Желудка	0,06 12	0,078 7	0,01 37	0,1 23	29,5 9
SKPNDW	Желудка	Желудка	3,6	10	7,83 88	10	2,58
SNU1	Желудка	Желудка	0,03 55	0,063 1	0,04 1	2,5 7	5,5
SNU16	Желудка	Желудка	10	10	3,29 68	5,1 1	10,6 6
SNU5	Желудка	Желудка	0,03 68	0,094 3	0,16 64	10	3,21
NTERA2C LD1	Яичка	Яичка	0,04 4	0,050 7	0,07 07	0,0 957	9,95
BHT101	Эндокринные	Щитовидной железы	0,03 76	0,041 2	0,04 38	0,0 864	22,5 2
CAL62	Эндокринные	Щитовидной железы	0,08 36	0,093 6	0,07 95	0,1 29	6,49
CGTHW1	Эндокринные	Щитовидной железы	0,05 47	0,060 5	0,06 5	0,1 03	91,5 5
SW579	Эндокринные	Щитовидной железы	0,04 77	0,070 8	0,13 74	0,2 56	51,2 2
TT	Эндокринные	Щитовидной железы	0,08 63	10	0,59 46	10	2,79
AN3CA	Женской	Матки	0,71	7,03	8,77	10	2,75

	мочеполовой системы		3		7		
HEC1A	Женской мочеполовой системы	Матки	1,8	2,81	1,65 52	3,7	30,1 2
KLE	Женской мочеполовой системы	Матки	10	10	10	10	1,37
RL952	Женской мочеполовой системы	Матки	0,00 9	0,059 9	0,17 62	10	4,12
SW954	Женской мочеполовой системы	Бульвы	0,11 4	0,142	0,17 49	0,5 21	9,14
SW962	Женской мочеполовой системы	Бульвы	0,08 28	0,232	0,06 86	10	3,39

Влияние на пролиферацию ГМК. Линии клеток ГМК обрабатывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 72 ч. В частности, Соединение 1 в различных концентрациях в диметилсульфоксиде (ДМСО) с помощью акустического дозатора (EDC ATS-100) помещали в пустой 384-луночный планшет. Соединение 1 помещали в планшет с 10-точечной схемой серийного разведения (3-кратное разведение) дважды для каждой концентрации. Готовили несколько одинаковых планшетов с помещенным в них Соединением 1 для использования с различными линиями клеток. После приготовления нескольких одинаковых планшетов все планшеты герметично закрывали (Agilent ThermoLoc) и хранили при -20°C в течение вплоть до 1 месяца. Когда планшеты были готовы к проведению анализа, их вынимали из морозильной камеры, размораживали оттаиванием и вскрывали непосредственно перед добавлением исследуемых клеток.

Перед проведением анализа клетки выращивали и размножали в колбах для культур для обеспечения достаточного количества исходного материала. Затем клетки разбавляли до соответствующих плотностей и добавляли непосредственно к 384-луночным планшетам с помещенным в них соединением. Клеткам давали расти в течение 72 ч при 37°C/5% CO₂. В момент добавления соединения (t₀) оценивали исходное число клеток с помощью анализа жизнеспособности (Cell Titer-Glo) путем количественного определения уровня люминесценции, генерируемой АТФ, присутствующей в жизнеспособных клетках. Через 72 ч жизнеспособность клеток, обработанных соединением, оценивали с помощью анализа Cell Titer-Glo и измерения люминесценции. Апоптотический ответ на Соединение 1 оценивали путем количественного определения активностей каспазы-3 и каспазы-7 (Caspase 3/7-Glo) в обработанных клетках и клетках, обработанных контролем ДМСО.

Определение значений GI₅₀ и IC₅₀. Для определения значения GI₅₀ соединения использовали четырехпараметрическую логистическую модель (сигмоидальная модель доза-ответ):

$$y=(A+((B-A)/(1+((C/x)^D))))$$

A=Y_{мин};

B=Y_{макс};

C=EC₅₀;

D=угловой коэффициент Хилла;

GI₅₀ представляет собой концентрацию соединения, когда Y=(Y_{макс}+Y_{t0})/2;

IC₅₀ представляет собой концентрацию соединения, когда Y=50% от контроля ДМСО;

Y=жизнеспособность клеток, измеренная в единицах люминесценции;

T₀=момент добавления соединения.

Пролиферацию и апоптоз измеряли с использованием анализа CellTiter-Glo и Caspase 3/7-Glo. Значения Cal_X2 представляют собой самую низкую концентрацию, при которой соединение 1 вызывает 2-кратное увеличение расщепленной каспазы-3/7 по сравнению с контролем ДМСО. Данные пролиферации и апоптоза представляют собой среднее значение по результатам 3 экспериментов.

Таблица 4. Действие соединения 1 на пролиферацию линии клеток ГКК

Линия клеток	GI ₅₀	IC ₅₀	Cal_X2
JHH-1	0,0016	0,0946	0,0427
JHH-5	0,0045	0,0072	0,0139
Hep3B	0,0053	0,0147	0,0028
HuH-7	0,0212	0,4894	0,0118
HuCC11	0,0253	1,3033	0,0213
Xyx-6-Clones	0,0291	1,2236	1,5813
SNU-387	0,0332	0,1041	0,0046
HepG2	0,0346	1,2420	0,0129
SNU-182	0,0764	4,9775	5,2385
JHH-7	0,0834	0,5476	4,7601
JHH-2	0,1289	4,4850	0,2806
HuH-1	0,2351	7,2643	6,5641
SNU-398	0,2652	1,9653	0,0378
JHH-4	0,3627	2,3178	0,0588
PLC-PRF-5	0,8884	4,0089	3,8310
FOCUS	1,4994	4,2962	3,8562
HepG2/C3A	4,6211	10,0000	0,8273
HLE	4,8451	9,6157	10,0000
SNU-423	6,2355	10,0000	10,0000
HLEF	6,6814	7,3878	7,2156
SK-HEP-1	7,0390	10,0000	10,0000
SNU-475	9,9879	10,0000	10,0000
JHH-6	10,0000	10,0000	10,0000
SNU-449	10,0000	10,0000	10,0000

Соединение 1 ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз в нескольких линиях ГКК.

Антипролиферативная активность в группе из 64 линий раковых клеток. Клетки обрабатывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 72 ч. Пролиферацию измеряли с использованием анализа CellTiter-Glo, как описано. Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5. Антипролиферативная активность соединения 1 в группе из 64 линий раковых клеток

Линия клеток	Вид опухоли	GI ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)
SW48	Толстой кишки	0,0057	0,088
MALME-3M	Меланома	0,0011	0,0038
HT29/219	Толстой кишки	0,0017	0,0045
HCT-116	Толстой кишки	0,017	0,022
LOX-IMVI	Меланома	0,022	0,025
HT29	Толстой кишки	0,016	0,025
A375	Меланома	0,021	0,024
Colo 205	Толстой кишки	0,025	0,040
AGS	Желудка	0,023	0,028
JHH-5	Печени	0,0045	0,007
SW620	Толстой кишки	0,047	0,092
MiaPaCa-2	Поджелудочной железы	0,047	0,80
JHH-5	Печени	0,0045	0,0072
SW620	Толстой кишки	0,0474	0,0918
MiaPaCa-2	Поджелудочной железы	0,0471	0,0798
JHH-1	Печени	0,0016	0,0946
NCI-H2122	Легкого	0,0318	0,0427
Нер3В	Печени	0,0053	0,0147
NCI-H1755	Легкого	0,0404	0,0584
92-1	Меланома	0,0102	0,0316
ВхРС-3	Поджелудочной железы	0,0368	0,0708
SW1417	Толстой кишки	0,0005	0,0169
HOP92	Легкого	0,1077	0,1173

NCI-H23	Легкого	0,0364	0,1821
PC-9	Легкого	0,2167	0,3791
HuH-7	Печени	0,0212	0,4894
MEL-202	Меланома	0,0385	0,0968
SW900	Легкого	0,0048	0,0217
NCI-H1299	Легкого	0,2336	0,4982
A549	Легкого	0,0402	0,0822
LOVO	Толстой кишки	0,0630	0,1256
NCI-H460	Легкого	0,2441	0,6445
SNU-387	Печени	0,0332	0,1041
HuCCТ1	Печени	0,0253	1,3033
HOP62	Легкого	0,3390	3,4861
HuH-6-Clone5	Печени	0,0291	1,2236
JHH-7	Печени	0,0834	0,5476
NCI-H838	Легкого	0,5670	9,1808
NCI-H226	Легкого	1,6266	6,1499
NCI-H28	Легкого	1,2797	2,3574
MDA-MB-231	Молочной железы	0,0353	3,3333
JHH-2	Печени	0,1289	4,4850
HepG2	Печени	0,0346	1,2420
RPMI-8226	Множественная миелома	3,2365	9,7392
K-562	Лейкоз	5,4223	6,0279
SNU-182	Печени	0,0764	4,9775
HuH-1	Печени	0,2351	7,2643
SNU-398	Печени	0,2652	1,9653
JHH-4	Печени	0,3627	2,3178

PLC-PRF-5	Печени	0,8884	4,0089
FOCUS	Печени	1,4994	4,2962
HerG2/C3A	Печени	4,6211	10,0000
HLE	Печени	4,8451	9,6157
SNU-423	Печени	6,2355	10,0000
HLF	Печени	6,6814	7,3878
SK-HEP-1	Печени	7,0390	10,0000
SNU-475	Печени	9,9879	10,0000
JHH-6	Печени	10,0000	10,0000
SNU-449	Печени	10,0000	10,0000
NCI-H441	Легкого	0,1838	6,3503
NCI-H1703	Легкого	1,3513	1,6795
NCI-H1975	Легкого	2,0476	3,1940
NCI-H520	Легкого	5,2445	8,3699
CFPAC-1	Поджелудочной железы	1,9512	7,3967
PANC-1	Поджелудочной железы	5,4360	10,0000
KATOIII	Желудка	7,0455	8,0240

Было показано, что соединение 1 ингибирует пролиферацию нескольких линий раковых клеток, полученных из KPP, меланомы, рака желудка, ГМК, рака легкого, рака поджелудочной железы, лейкоза и множественной миеломы.

Антипролиферативная и апоптотическая активность в BRAF-мутантных и бета-катенин-мутантных или активных линиях раковых клеток. Статус мутации BRAF, CTNNB1, KRAS и EGFR в пяти оцененных линиях клеток определялся на общедоступных данных (COSMIC и CCLE) и был подтвержден внутренним исследованием. Статус β -катенина оценивали с использованием репортерной системы TOP Flash с помощью транзientной трансфекции. Линию клеток определяли как β -катенин-активную, если отношение репортера Top Flash к репортеру For Flash превышало 2. н.д.: нет данных.

Эффективность трансфекции в Colo 205 (BRAF V600E) была слишком низкой для оценки активности β -катенина в этой линии клеток с использованием данного подхода. Антипролиферативную и апоптотическую активность Соединения 1 в пяти линиях клеток измеряли, как описано выше.

Таблица 6. Антипролиферативная и апоптотическая активность соединения 1 в BRAF-мутантных и бета-катенин-мутантных и активных линиях клеток

Линии клеток	Вид опухоли	Статус мутации ключевых генов	Статус β -катенина	IC ₅₀ пролиферации (мкМ)	CaIX2 индукции апоптоза (мкМ)
Colo 205	KPP	BRAF (V600E)	н.д.	0,036 +/- 0,023	0,053 +/- 0,039
LOX-IMVI	Меланома	BRAF (V600E)	Неактивный	0,025 +/- 0,008	0,034 +/- 0,028
SW48	KPP	CTNNB1 (S33Y); EGFR (G179S)	Активный	0,009 +/- 0,007	0,005 +/- 0,001
AGS	Желудка	CTNNB1 (G43E); KRAS (G12D)	Активный	0,028 +/- 0,021	0,004 +/- 0,002
Her3B	ГМК	-	Активный	0,014 +/- 0,006	0,002 +/- 0,002

Соединение 1 эффективно ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз как в BRAF-мутантных, так и в бета-катенин-мутантных или активных линиях раковых клеток, включая BRAF-мутантный KPP, BRAF-мутантную меланому, β -катенин-мутантный/EGFR-мутантный KPP (т.е. бета-катенин-активный/EGFR-мутантный KPP), бета-катенин-мутантный/KRAS-мутантный рак желудка (т.е. бета-катенин-активный/KRAS-мутантный рак желудка) и ГМК.

Ингибирование онкогенного сигнального пути. Влияние на передачу сигналов MAPK. Раковые клетки высевали с плотностью 25000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты для культивирования тканей и инкубировали при 37°C в инкубаторе с CO₂ в течение ночи. После обработки соединением 1 при 37°C в течение 2 ч клетки лизировали в буфере для лизиса Mesoscale и измеряли уровни pRSK S380 в каждом лизате с помощью технологии Mesoscale ELISA.

Вывод. Соединение 1 эффективно ингибирует pRSK1 в нескольких линиях раковых клеток (табл. 7).

Таблица 7. Значения IC₅₀ pRSK1 S380 для соединения 1 в BRAF-мутантных линиях раковых клеток LOX-IMVI и Colo 205

Линия клеток (n=3)	IC ₅₀ pRSK1 S380 (мкМ)
LOX-IMVI	0,038 +/- 0,009
Colo 205	0,047 +/- 0,01
SW48	0,021 +/- 0,001
AGS	0,020 +/- 0,001

В эксперименте по определению временной зависимости линии раковых клеток Colo-205 обрабатывали 0,5 мкМ соединения 1 в течение различных периодов времени. Действие соединения 1 на pRSK S380 измеряли, как описано. Действие соединения 1 на другие маркеры сигнального пути MAPK (DUSP4 и DUSP6) измеряли с помощью вестерн-блоттинга со специфичными антителами. Данные временной зависимости на фиг. 1 указывают, что соединение 1 вызывает устойчивое ингибирование (до 72 часов) следующих мишеней ERK: pRSK1, DUSP4 и DUSP6. Ингибиторы BRAF (BRAFi) не вызывают устойчивого ингибирования ERK в BRAF-мутантных линиях KPP (Corcoran et al., Cancer Discov. 2012, 2: 227-35). Достаточное и устойчивое ингибирование ERK, по-видимому, имеет решающее значение для клинической эффективности BRAFi и ингибиторов MEK (MEKi) в BRAF-мутантной меланоме (Bollag et al., Nat Rev Drug Disc. 2012; 11, 873-886) и у пациентов с KPP (Corcoran et al., Cancer Discov. 2012, 2: 227-35). Отсутствие устойчивого ингибирования ERK BRAFi может способствовать отсутствию клинической активности BRAFi у пациентов с BRAF-мутантным KPP. Устойчивое ингибирование ERK соединением 1 может обеспечить преимущество по сравнению с BRAFi у пациентов с BRAF-мутантным KPP.

Способность соединения 1 ингибировать передачу сигналов MAPK оценивали путем определения экспрессии белка DUSP4 и DUSP6. Культуры линии клеток рака толстой кишки Colo 205 (BRAF V600E) обрабатывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 2, 8 или 24 ч. Белки выделяли из обработанных клеток и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против DUSP4, DUSP6, циклина D1, с-Мус, YAP или β -актина. Выделяли РНК с помощью набора Cell-To-CT и проводили количественную ПЦР с помощью зондов, специфичных для DUSP4, DUSP6, SPRY2, с-Мус и циклина D1. Для нормализации использовали специфичные зонды для β -актина.

В Colo 205 (BRAF V600E) DUSP4 и DUSP6 были значительно снижены соединением 1 уже через 2 часа, и снижение продолжалось в течение 24 ч (фиг. 2A). Обработка соединением 1 приводила к снижению транскрипции SPRY2 зависимым от концентрации образом в Colo 205 (фиг. 2B), что согласуется с эффективным ингибированием ERK. Были оценены уровни циклина D1 и с-Мус, расположенных ниже канонического пути передачи сигналов Wnt и MAPK. Соединение 1 значительно уменьшало уровни РНК и белка циклина D1 и с-Мус в клетках Colo 205 (фиг. 2A-2C). Обработка соединением 1 приводила к уменьшению уровня белка YAP через 24 ч в Colo 205 (фиг. 2A). В совокупности полученные клеточные данные согласуются с сильным, устойчивым ингибированием сигнального пути MAPK.

Для дальнейшей оценки способности соединения 1 ингибировать передачу сигналов MAPK оценивали экспрессию РНК дополнительных мишеней MAPK (BMF, DUSP5, DUSP6, EFNA1, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, GJA1, ИЛ-8, SPRY2 и SPRY4). Культуры линий клеток рака толстой кишки Colo 205 (характеризующихся мутацией BRAF V600E) и HT-29 (характеризующихся мутацией BRAF V600E) обрабатывали ДМСО или соединением 1 в концентрации 0,3 или 1 мкМ в течение 6 ч. РНК выделяли с помощью набора МадМАХ Total RNA Isolation kit и проводили количественную ПЦР с помощью зондов, специфичных для BMF, DUSP5, DUSP6, EFNA1, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, GJA1, ИЛ-8, SPRY2, SPRY4. Для нормализации использовали специфичные зонды для 18S рРНК.

В обеих клеточных линиях соединение 1 снижало уровни мРНК DUSP5, DUSP6, EGR1, ETV5, FOS, FOSL1, ИЛ-8, SPRY2, SPRY4 (фиг. 2D-2I), что согласуется с ингибированием ERK. Обнаружение того, что уровни мРНК GJA1 уменьшаются в клетках Colo205 и увеличиваются в HT29, может быть связано с обнаружением авторами изобретения того, что соединение 1 является цитотоксичным в Colo205 и цитостатическим в HT29. Обработка соединением 1 приводила к увеличению уровней мРНК BMF и EFNA1

через 6 ч в Colo 205 и HT-29. В совокупности полученные клеточные данные согласуются с ингибированием сигнального пути MAPK.

Влияние на передачу сигналов бета-катенином и YAP. Была оценена клеточная активность соединения 1 против генов-мишеней бета-катенина и YAP. Культуры линии клеток рака толстой кишки Colo 205 (BRAF V600E) обрабатывали ДМСО или возрастающими концентрациями соединения 1 в течение 2, 8 или 24 ч. РНК выделяли с помощью набора Cell-To-CT и проводили количественную ПЦР с помощью зондов, специфичных для аксина 2, CTGF и AREG. Для нормализации использовали специфичные зонды для β -актина.

Обработка соединением 1 приводила к увеличению РНК аксина 2 (фиг. 3А). Соединение 1 значительно уменьшало экспрессию генов-мишеней Hippo/YAP (CTGF, AREG) в Colo 205 (BRAF V600E) через 2, 8 и 24 ч (фиг. 3А). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что соединение 1 влияет на передачу сигналов Wnt и блокирует передачу сигналов Hippo в раковых клетках Colo 205.

Была оценена клеточная активность соединения 1 против дополнительных генов-мишеней YAP (фиг. 3В-3Е). Культуры линий клеток рака толстой кишки Colo 205 и HT-29 обрабатывали ДМСО или соединением 1 в концентрации 0,3 или 1 мкМ в течение 6 ч. РНК экстрагировали с помощью набора MagMAX Total RNA Isolation kit и проводили количественную ПЦР с помощью зондов, специфичных для CYR61, CITED2, CXCL1, ELF3, HAS2, HES1 и MAFF. Для нормализации использовали специфичные зонды для 18S рРНК.

В обеих линиях клеток соединение 1 снижало уровни мРНК CYR61, CXCL1, HAS2, HES1 и MAFF. Обнаружение того, что уровни мРНК CYR61 уменьшаются в клетках Colo205, но не в HT29, и что уровни мРНК CITED2 увеличиваются в HT29, но не в Colo205, могут быть связаны с обнаружением авторами изобретения того, что соединение 1 является цитотоксичным в Colo205 и цитостатическим в HT29. Обработка соединением 1 приводила к увеличению уровней мРНК для CITED2 и мРНК ELF3 через 6 ч в Colo 205 и HT-29. (фиг. 3В) В совокупности полученные клеточные данные согласуются с ингибированием сигнального пути YAP.

Оценка чувствительности в линиях клеток, имеющих мутации гена β -катенина. Было оценено действие Соединения 1 на линии клеток, имеющие мутации гена β -катенина. (фиг. 18 и фиг. 19А-19В). Соединение 1 показало эффективность против линий клеток с мутацией гена β -катенина. Такие линии клеток демонстрируют, что виды рака, характеризующиеся мутацией гена β -катенина, более чувствительны к обработке соединением 1. Было также показано, что соединение 1 модулирует β -катенин и YAP в BRAF- и CTNNB1-мутантных линиях клеток, как показано на фиг. 20. Соединение 1 также модулирует экспрессию гена-мишени, контролируемую MAPK, β -катенина и YAP, в BRAF- и CTNNB1-мутантных линиях клеток, как показано на фиг. 21А и фиг. 21В.

Вестерн-блоттинг. Модуляция соединением 1 маркеров сигнального пути MAPK, WNT/ β -катенина и Hippo/YAP оценивали с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Клетки LOX-IMVI, SW48 и Colo-205 высевали в 6-луночные планшеты с плотностью 250 000 клеток на лунку, и давали им прикрепиться в течение ночи. Соединение 1 добавляли к клеткам в концентрациях 0,03, 0,1, 0,3, 1 и 3 мкМ на 2, 8 и 24 ч. Клетки собирали и лизировали в буфере RIPA (50 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 150 мМ хлорида натрия [NaCl], 0,25% дезоксихолевой кислоты, 1% Nonidet P-40, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты [ЭДТА], ингибиторы протеазы и фосфатазы). Клеточные лизаты нагревали в додецилсульфате натрия (SDS)-буфере для образцов и загружали 40 мкг клеточного лизата на состояние на гели и разделяли с использованием электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (PAGE). Белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили иммуноблоттинг с антителами против DUSP4, DUSP6, сMyc, циклина D1, YAP, аксина 2, HDAC5 (фосфо S498) и β -актина. Мембраны сканировали в системе Licor Odyssey.

Количественная полимеразная цепная реакция. Была оценена модуляция соединением 1 генов сигнальных путей MAPK, WNT/ β -катенина и Hippo/YAP с помощью количественной ПЦР в реальном времени (RT). Клетки лизилоксидаза-IMVI, SW48 и Colo-205 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 20000 клеток на лунку, и давали им прикрепиться в течение ночи. Соединение 1 добавляли к клеткам в полулогарифмических концентрациях от 1 нМ до 10 мкМ на 2, 8 и 24 ч. Клетки собирали с использованием набора TaqMan Gene Expression Cells-to-CT в соответствии с инструкцией. Затем проводили ПЦР в реальном времени и использовали полученную кДНК в реакциях количественной ПЦР в системе ViiA7 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Датчики TaqMan использовали для наблюдением за изменениями в генах DUSP4, DUSP6, SPRY2, MYC, CCND1, аксин 2, CTGF, Cyr61, AREG и ACTB. Все гены были нормализованы к экспрессии ACTB и значения указаны как процент от контроля только с ДМСО.

Анализ экспрессии генов. Клетки бронхиального эпителия человека культивировали в колбах T-150 в среде для выращивания BEriCM и давали им достичь 80% конfluence. Клетки высевали в 12-луночные пластиковые культуральные планшеты в количестве 150 000 клеток на лунку в среде BEriCM на 2 4 часа. После инкубации в течение 24 ч клетки обрабатывали диметилсульфоксидом (ДМСО) в качестве контроля, соединением 1 в концентрации 0,1, 1, 10 мкМ в течение 30 мин. Затем клетки стимули-

рвали с помощью 100 нг/мл рекомбинантного Wnt3a (приготовленного в натрий-фосфатном буфере [PBS]), 350 пМ RSPO3 (приготовленного в PBS) или комбинации Wnt3 и RSPO3 в течение 24 ч. Рибонуклеиновую кислоту (РНК) выделяли с помощью набора Mini Qiagen Rneasy в соответствии с инструкцией производителя. Экспрессию аксина 2 и генов определяли с помощью анализов с полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ПЦР в реальном времени) от Taq-Man. Количественную ПЦР (кПЦР) проводили с помощью одностадийной системы ПЦР в реальном времени Superscript® III и работали на системе ПЦР в реальном времени Viiia 7. Данные нормировали к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе. Соединение 1 ингибирует экспрессию аксина 2 в клетках бронхиального эпителия человека. Экспрессию гена измеряли через 24 ч. Эти результаты показывают, что Соединение 1 ингибирует экспрессию аксина 2 в клетках бронхиального эпителия человека. (фиг. 22).

Долгосрочный анализ колоний. Оценивали способность соединения 1 ингибировать образование колоний раковых клеток с помощью долгосрочного анализа образования колоний. Клетки и соединения добавляли в 96-луночные планшеты и наблюдали за ними в течение до 8 недель для образования колоний. Соединение и среды восполняли каждую неделю в течение всего анализа. Образование колоний обнаруживали с помощью визуализации с 4-кратным увеличением в системе IncuCyte ZOOM. Соединение 1 демонстрировало ингибирование образования колоний β -катенин-мутантных клеток на уровне, превышающем ингибиторы MEK (траметиниб) и ингибиторы ERK (GDC0994). Клетки SW48 (рака толстой кишки), клетки HCT-116 (рака толстой кишки), клетки AGS (рака желудка) и клетки Hep3B (ГМК) были обработаны соединением 1 и демонстрировали более высокие уровни ингибирования, чем демонстрируемые при обработке ингибиторами MEK или ингибиторами ERK. (фиг. 23A-23D). Было также показано, что соединение 1 неожиданно ингибирует образование колоний клеток AGS, устойчивых к обработке ингибитором MEK траметинибом. Такие результаты дают основания предполагать, что описанные в настоящем документе аминопуриновые соединения, такие как соединение 1, могут быть пригодны для лечения рака, устойчивого к другим методам лечения.

Оценка иммуномодулирующих действий. Действие соединения 1 оценивали на уровнях экспрессии PD-L1. Клетки культивировали в присутствии или в отсутствие соединения 1 в течение указанного времени перед измерением уровней экспрессии PD-L1, DUSP4 и α -тубулина или α -актина с помощью вестерн-блоттинга. Для определения уровней PD-L1 на клеточной поверхности клетки обрабатывали ДМСО или соединением 1 в указанных концентрациях в течение 48 ч и детектировали экспрессию PD-L1 на клеточной поверхности с помощью анализа проточной цитометрии (FACS) с APC-меченым антителом к PD-L1 (клон 29E.1A3.; BioLegend, Сан-Диего, Калифорния). Геометрическое среднее для PD-L1-положительных клеток определяли с помощью FlowJo 10 (Treestar, Ашленд, Орегон).

Вывод. Соединение 1 непосредственно ингибирует экспрессию PD-L1 в нескольких линиях раковых клеток, включая HOP62, KARPAS-299 и LOX-IMVI (BRAF V60 0E) (фиг. 4A). Анализ FACS указывает на то, что уровни PD-L1 на клеточной поверхности также ингибируются соединением 1 в нескольких линиях раковых клеток (фиг. 4B).

Чтобы определить, усиливает ли активацию Т-клеток понижающая регуляция PD-L1 соединением 1, линии раковых клеток KARPAS-299, обработанные соединением, культивировали совместно с Т-клетками, полученными из МНПК, стимулированными с помощью низких концентраций суперантигена (SEB). Клетки KARPAS-299 обрабатывали ДМСО (D) или соединением 1 в указанных концентрациях в течение 48 ч. МНПК от здоровых доноров обрабатывали или не обрабатывали 20 нг/мл SEB в течение 48 ч. РВМС после промывки PBS инкубировали с раковыми клетками в течение 24 ч и собирали супернатанты для измерения ИЛ-2 и ИФН γ с помощью анализов на основе Mesoscale.

Уровни ИЛ-2 и ИФН γ в супернатанте использовали в качестве функциональных маркеров активации Т-клеток. В отсутствие SEB МНПК, совместно культивированные с клетками KARPAS-299, обработанными соединением 1, продуцировали малое количество ИЛ-2 или ИФН γ . В присутствии низких концентраций SEB (20 нг/мл) обработанные соединением 1 раковые клетки, совместно культивируемые с МНПК, демонстрировали повышенные уровни продуцирования как ИЛ-2, так и ИФН γ (фиг. 5A-5B). Повышенные уровни ИЛ-2 и ИФН γ в обработанных соединением 1 раковых клетках были аналогичны уровням, наблюдаемым при обработке антителом к PD-L1 (Ultra-LEAFTM от Biolegend).

Действие обработки соединением 1 на уровни ИЛ-8 определяли в культуральных средах МНПК. МНПК выделяли из цельной крови и культивировали в среде RPMI с 10% FBS. МНПК высевали в количестве 1×10^6 на миллилитр на чашки величиной 10 см². МНПК обрабатывали 0,1% ДМСО или 0,5 мкМ соединения 1. Результаты обработки регистрировали в установленные моменты времени. Культуральную среду (1 мл) использовали для анализа на ИЛ-8. Анализ на ИЛ-8 проводили с помощью набора Mesoscale V-Plex Human IL-8 в соответствии с инструкциями производителя. Было показано, что Соединение 1 ингибирует уровни ИЛ-8 в различные моменты времени (фиг. 5C).

Анализ репортера TEAD. Активность репортера TEAD анализировали с использованием клеток WI38 VA13, стабильно экспрессирующих реагирующий синтетический промотор YAP/TAZ, стимулирующий экспрессию люциферазы (8хСТПС-люцифераза). 10000 клеток на лунку высевали на 96-луночный планшет с белыми лунками и оставляли на ночь. Через 16-20 ч клетки обрабатывали соедине-

нием и измеряли активность репортера TEAD спустя 24 или 72 ч с помощью анализа Bright Glo luciferase (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Этот анализ проводили 3 раза для Соединения 1 и дважды для траметиниба. См. фиг. 25.

Анализ жизнеспособности. Параллельно в каждую лунку 96-луночного планшета с черными лунками высевали 10000 клеток WI38 VA13, экспрессирующих 8хГПС-люциферазу. Через 16-20 ч клетки обрабатывали соединением в течение 24 или 72 ч. В это время среду, содержащую сыворотку и соединение, удаляли и заменяли 100 мкл бессывороточной среды и 100 мкл Cell Titer Fluor (Promega). Перед считыванием сигнала флуоресценции планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Этот анализ основан на измерении активности протеаз в живых клетках. Анализ жизнеспособности проводили для подтверждения того, что любые действия соединений на репортер TEAD не являются результатом действия соединения на жизнеспособность. Этот анализ проводили 3 раза для соединения 1 и дважды для траметиниба.

Вывод. Эти данные дают дополнительную терапевтическую гипотезу, дающую основания полагать, что лечение Соединением 1 будет усиливать активацию Т-клеток. Данные *in vitro* дают основания полагать, что Соединение 1 может усиливать Т-клеточный иммунитет против раковых клеток путем ингибирования ключевых онкогенных сигнальных путей, таких как сигнальный путь MAPK, и понижающей регуляции экспрессии молекулы иммунной контрольной точки PD-L1 в микроокружении опухоли. Таким образом, виды рака, экспрессирующие высокие уровни PD-L1 (например, меланома, рак легкого, ПКК или ГКК), могут быть чувствительны к соединению 1.

Модели на животных

Ксенотрансплантатные модели. Для исследования на ксенотрансплантатных моделях линии клеток рака человека вводили мышам с ТКИД (тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Линии раковых клеток размножали в культуре *in vitro*. Животных с опухолью получали путем инъекции точно определенного количества клеток в организм мышей. После прививки животным опухолям давали расти до определенного размера перед случайным распределением в группы. Мышей с ксенотрансплантатами опухолей в заранее определенном диапазоне размеров объединяли и случайным образом распределяли в различные группы лечения. Характерная схема исследования эффективности включала введение одного или более соединений с различными уровнями дозы мышам с опухолями. Кроме того, аналогичным образом вводили и поддерживали сравнительные химиотерапевтические агенты (положительный контроль) и отрицательные контроли. В ходе исследования осуществляли измерения опухоли и массы тела.

Мышей подвергали ингаляционной анестезии изофлураном, а затем подкожно прививали опухолевые клетки LOX-IMVI выше правой задней лапы, используя 0,1 мл суспензии отдельных клеток в PBS с помощью стерильного шприца объемом 1 мл, снабженного иглой 26 калибра. После прививки животным опухолям давали расти до приблизительно 75-125 мм³ или, в некоторых случаях, 250-400 мм³, до распределения мышей в группы случайным образом. Опухоль каждого животного измеряли и включали в исследование животных с опухолями в подходящем диапазоне. Животных из пула исследования затем случайным образом распределяли в различные клетки, и клетки случайным образом относили к группам с носителем, положительным контролем или исследуемыми соединениями. Все мыши были помечены металлическими ушными бирками на правом ухе. Типичная группа состояла из 8-10 животных. Для типичного исследования ксенотрансплантата мышей ТКИД с опухолями случайным образом распределяли в группы и вводили им дозу соединений в пределах, например, от 100 мг/кг до 0,1 мг/кг при различных режимах дозирования, включая, но не ограничиваясь перечисленным, *p*/сут, раз в 2 дня, раз в 3 дня, раз в 5 дней, раз в 7 дней и 2 *p*/сут. Мышам вводили дозы в течение 1-4 недель. Опухоли измеряли два раза в неделю, используя циркуль, и объемы опухоли рассчитывали по формуле $W^2 \times L/2$.

Цель этих исследований состояла в том, чтобы исследовать эффективность соединения 1 в ксенотрансплантатных моделях, полученных из линий клеток LOX-IMVI (меланомы) и Colo205 (колоректального рака) и ксенотрансплантатной модели колоректального рака PDX1994060146 (модель ксенотрансплантата, полученного от пациента [PDX146]). Эти модели были выбраны потому, что они содержат мутацию V600E BRAF. Был проведен дополнительный анализ ФК/ФД для изучения опосредованного Соединением 1 ингибирования биомаркеров сигнального пути в ксенотрансплантатной модели PDX146.

Ксенотрансплантатная модель подкожной меланомы LOX-IMVT. Цель этого исследования состояла в том, чтобы подтвердить эффективность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели меланомы LOX-IMVI. Одно исследование (фиг. 6) в ксенотрансплантатной модели LOX-IMVI, включавшее тестирование двух уровней дозы соединения 1 (15 и 30 мг/кг), продемонстрировало значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем носителем ($p < 0,001$ для обеих уровней дозы). Регрессия опухоли наблюдалась у 9 из 9 животных для обеих уровней дозы, и 1 из 9 животных из каждой группы не имело опухоли в конце исследования.

В отдельном эксперименте соединение 1 вводили перорально, *p*/сут в течение 8 дней в концентрации 0,2, 1, 5, 10 и 15 мг/кг. Дозозависимая противоопухолевая активность наблюдалась при лечении соединением 1 в ксенотрансплантатной модели LOX-IMVI (фиг. 7). Регрессия опухоли наблюдалась при уровнях дозы 10 и 15 мг/кг.

Подкожная ксенотрансплантатная модель колоректального рака Colo 205. Цель этих исследований состояла в том, чтобы исследовать эффективность соединения 1 в ксенотрансплантатной модели колоректального рака Colo 205 и определить, влияет ли дозирование два раза в сутки (2 р/сут) на противоопухолевую активность. В первом эксперименте Соединение 1 вводили перорально, р/сут в течение 15 дней в концентрации 0,2, 1, 5, 10 и 15 мг/кг. Дозозависимая противоопухолевая активность наблюдалась при лечении соединением 1 в ксенотрансплантатной модели Colo 205 (фиг. 8). Было проведено исследование режима введения, чтобы определить, увеличивает ли дозирование 2 р/сут противоопухолевую активность соединения 1. Дозозависимая противоопухолевая активность наблюдалась при лечении соединением 1 в ксенотрансплантатной модели Colo 205 (фиг. 9).

Подкожная ксенотрансплантатная полученная от пациента модель колоректального рака PDX1994060146. Цель этих исследований состояла в том, чтобы исследовать эффективность Соединения 1 в ксенотрансплантатной модели колоректального рака PDX1994060146 (PDX146) и определить, влияет ли дозирование 2 р/сут на противоопухолевую активность. Было проведено исследование времени до прогрессирования (ВДП) для определения влияния более длительной продолжительности лечения на рост опухоли.

В первом эксперименте соединение 1 вводили перорально, р/сут в концентрации 1, 5 и 15 мг/кг или 5 и 15 мг/кг 2 р/сут в течение 22 дней. Дозозависимая противоопухолевая активность наблюдалась при лечении соединения 1 в ксенотрансплантатной модели PDX146 (фиг. 10A-10B). Дозировка 15 мг/кг 2 р/сут, по-видимому, увеличивала противоопухолевую активность соединения 1 по сравнению с введением 15 мг/кг р/сут.

В исследовании ВДП соединение 1 вводили перорально, в концентрации 1, 5 и 15 мг/кг 2 р/сут в течение 49-77 дней. Группам лечения соединением 1 вводили дозы в течение всего времени исследования до тех пор, пока среднее значение группы не достигло заданной конечной точки приблизительно 1200 мм³, или прекращения исследования. Задержку роста опухоли (TGD) рассчитывали как время между прекращением участия в исследовании контрольной группы носителя (на 43 день) и групп лечения.

Соединением 1. TGD составляла 8, 12 и >37 дней для групп лечения 1, 5 и 15 мг/кг, соответственно. (фиг. 11).

Биомаркеры, отражающие активность трех различных сигнальных путей, MAPK, Wnt и Hippo, были ингибированы в ксенотрансплантатной модели PDX146. Устойчивое ингибирование этих биомаркеров сигнальных путей наблюдалось через 24 ч.

Противоопухолевая активность Соединения 1 в ксенотрансплантатной модели β-катенин-мутированного колоректального рака SW48. Самкам мышей линии ТКИД прививали 2×10⁶ опухолевых клеток SW48 в правый бок. В начале лечения мышам случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Обработку исследуемым соединением начинали на 10 день, когда опухоли составляли примерно 110 и 105 мм³. (См. фиг. 15A-15B.) Черная пунктирная линия обозначает объем опухоли на момент начала введения доз. График слева представляет собой исследование зависимости "доза-ответ". График справа представляет собой исследование времени до прогрессирования, в ходе которого животные постоянно получали лекарственное средство. Пунктирная линия обозначает объем опухоли на 28 день, когда обработку группы контроля носителем прекращали.

Противоопухолевая активность в ортотопическом ксенотрансплантате гепатоклеточной карциномы Нер3В2.1-7. Самкам мышам ТКИД ортотопически прививали 2×10⁶ опухолевых клеток Нер3В2.1-7 на животное. Через семь дней после прививки животных случайным образом распределяли в группы лечения по массе тела и начинали лечение (0 день исследования). Оценка степени приживаемости в сателлитной группе подтвердила наличие опухоли печени у 100% животных. Начинали лечение соединением 1 и вводили дозы соединения 1 перорально, р/сут в течение 21 дня. Значительная средняя потеря массы тела, ожидаемая с этой моделью, наблюдалась в контрольной группе носителя. Животные, получавшие лечение 15 мг/кг соединения 1, показали минимальную потерю массы тела, и значительное среднее увеличение массы тела наблюдалось в группе лечения 30 мг/кг соединения 1. В день прекращения исследования опухоли удаляли и взвешивали. На график наносили массы отдельно взятых опухолей и среднюю массу опухоли ± SEM для каждой группы (фиг. 16). Процент ингибирования рассчитывали относительно контроля носителем. Значения P получали из одностороннего ANOVA с последующим тестом Дюннета. ***=p<0,001.

Противоопухолевая активность соединения 1 в ксенотрансплантатной полученной от пациента модели гепатоклеточной карциномы LI0612 с амплификацией C-Met. Самкам мышам линии ТКИД инокулировали фрагменты опухолей PDX (полученной от пациента) модели гепатоклеточной карциномы LI0612 (диаметром 2-4 мм) в правый бок. В начале лечения мышам случайным образом распределяли в группы лечения (n=10/группа). Лечение исследуемым соединением начинали на 18 день, когда размер опухолей составлял приблизительно 150 мм³. Рост опухоли прогрессировал в группах контроля носителем и лечения соединением 1 за период введения доз. Изменение кинетики роста отмечалось при введении соединения 1, что приводило к значительному ингибированию роста опухоли (TGI) при введении 30 мг/кг (p=0,038 по сравнению с контролем носителем). См. фиг. 17.

Фармакокинетические/фармакодинамические данные в ксенотрансплантатной полученной от пациента BRAF-мутантной модели. На основании известных киназ (ERK 1/2, NLK и SIK), ингибируемых Соединением 1, было оценено влияние лечением соединением на биомаркеры сигнальных путей MAPK, β -катенина и Hippo в опухолях PDX146, полученных от мышей с ксенотрансплантатами. Мыши с опухолями (опухоль имели размер приблизительно 400 мм³) получали лечение разовой дозой 1 или 5 мг/кг Соединения 1. Опухолевую ткань собирали через 1, 2, 4, 8 и 24 ч после введения дозы.

Модуляцию сигнального пути MAPK оценивали путем изучения опухолевых уровней мРНК DUSP4, DUSP6 и Sprouty (SPRY2) и уровней белков pRSK и pERK. Уровни мРНК DUSP6 были значительно снижены при лечении соединением, начиная с 2 ч после введения дозы, и оставались сниженными до 24 ч при обоих уровнях дозы (фиг. 12A). Аналогичная картина наблюдалась с уровнями мРНК DUSP4 и SPRY2 (фиг. 13A-13B). Уровни белка фосфо-RSK (pRSK) и фосфо-ERK (pERK) были модулированы в результате лечения соединением 1 зависимым от дозы и времени образом (фиг. 14A-14D). Уровни cMyc (фиг. 12B) и циклина D1 (фиг. 13C), нижележащие в сигнальных путях MAPK и Wnt, были ингибированы в результате лечения соединением 1. Лечение соединением 1 повышающе регулировало ген-мишень Wnt, аксин 2. Лечение соединением 1 при обоих уровнях дозы демонстрировало значительное увеличение уровней мРНК аксина 2 через 24 ч после введения дозы. Устойчивое ингибирование уровней мРНК AREG (нижележащего гена-мишени в сигнальном пути Hippo) наблюдалось через 24 ч. Кроме того, соединение 1 ингибировало уровни белка YAP зависимым от времени образом (не статистически значимо (см. фиг. 13D), что может быть связано с ингибированием SIK и регуляцией сигнального пути Hippo или косвенным эффектом в результате ингибирования MAPK.

Эти данные дают основания полагать, что соединение 1 воздействует на три разных сигнальных пути: MAPK, Wnt и Hippo, в данной PDX модели BRAF-мутантного колоректального рака после разового введения дозы.

Вывод. Значительная дозозависимая противоопухолевая активность наблюдалась во всех трех ксенотрансплантатных BRAF-мутантных моделях (см. фиг. 15A-15B, фиг. 16 и фиг. 17). Регрессия опухоли наблюдалась при лечении соединением 1 во всех моделях, и наблюдалась значительная задержка роста при длительном лечении в модели PDX146.

Обогащение популяции пациентов и опухолевые показания. Основываясь на данных *in vitro* и *in vivo*, полученных для соединения 1, гипотезы о обогащении популяции пациентов и опухолевых показаниях изложены в табл. 8 и табл. 9.

Таблица 8. Биомаркеры обогащения пациентов и опухолевые показания

Биомаркеры обогащения популяции пациентов	Опухолевые показания
BRAF-мутантный	KPP, рак щитовидной железы, меланома, рак легкого
NRAS-мутантный	Меланома
KRAS-мутантный	Рак легкого, KPP, рак поджелудочной железы
CTNNB1 (β -катенин-мутантный и/или активный)	KPP, рак желудка, ГМК, саркома

Таблица 9

Молекулярные изменения	Сигнальные пути	Клинические показания
CTNNB1-мутантный, усиление YAP	Wnt/ β -катенин// Hippo	ГМК
BRAF-мутантный, CTNNB1	MAPK//Wnt/ β -катенин	KPP
CTNNB1-мутантный	Wnt/ β -катенин	Рак желудка
BRAF-мутантный, NRAS-мутантный	MAPK	Меланома

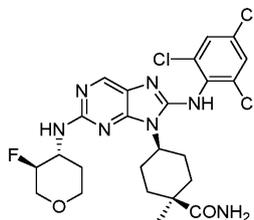
Был цитирован ряд источников, содержания которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Хотя изобретение было описано со ссылкой на раскрытые варианты осуществления, специалисты в данной области техники легко поймут, что конкретные примеры и исследования, подробно описанные

выше, являются только иллюстрацией изобретения. Следует понимать, что могут быть сделаны различные модификации без отклонения от сущности изобретения. Соответственно, изобретение ограничивается только следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, имеющему рак, эффективного количества (1S,4S)-4-(2-(((3S,4R)-3-фтортетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-8-((2,4,6-трихлорфенил)амино)-9H-пурин-9-ил)-1-метилциклогексанкарбоксиамида, имеющего следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемой соли или таутомера, где рак представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, почечно-клеточную карциному, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, гепатоклеточную карциному, рак печени, рак легких, рак поджелудочной железы, лейкоз или множественную миелому.

2. Способ по п.1, где рак представляет собой колоректальный рак, рак желудка, рак толстой кишки или рак желудочно-кишечного тракта.

3. Способ по п.1, где рак представляет собой рак печени, рак легких или рак поджелудочной железы.

4. Способ по п.1, где рак представляет собой лейкоз или множественную миелому.

5. Способ по п.1, где рак представляет собой гепатоклеточную карциному.

6. Способ по п.1, где рак представляет собой рак, экспрессирующий PD-L1.

7. Способ по п.6, где рак, экспрессирующий PD-L1, представляет собой рак легкого, почечно-клеточную карциному или гепатоклеточную карциному.

8. Способ по п.1, где рак представляет собой рак, характеризующийся мутацией BRAF.

9. Способ по п.8, где рак, характеризующийся мутацией BRAF, представляет собой колоректальный рак или рак легкого.

10. Способ по п.8, где мутация BRAF представляет собой BRAF V660E.

11. Способ по п.1, где рак характеризуется мутацией NRAS.

12. Способ по п.1, где рак характеризуется мутацией KRAS.

13. Способ по п.12, где рак, характеризующийся мутацией KRAS, представляет собой колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак легкого.

14. Способ по п.1, где рак характеризуется активированным сигнальным путем бета-катенина.

15. Способ по п.14, где рак представляет собой колоректальный рак, рак желудка или гепатоклеточную карциному.

16. Способ по п.1, где аминопуриновое соединение вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

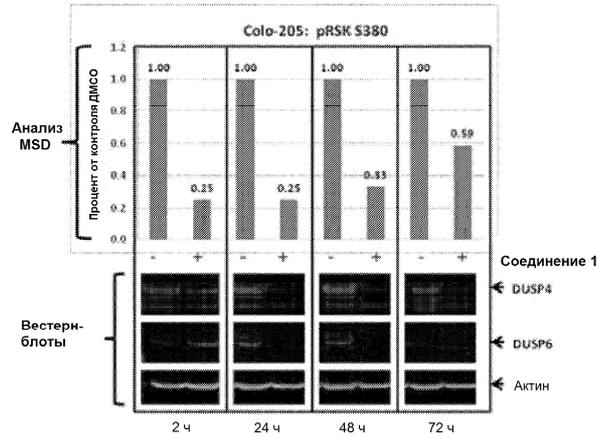
17. Способ по п.14, где рак представляет собой гепатоклеточную карциному или рак желудочно-кишечного тракта.

18. Способ по п.14, где рак дополнительно характеризуется мутацией EGFR или повышенной активностью EGFR.

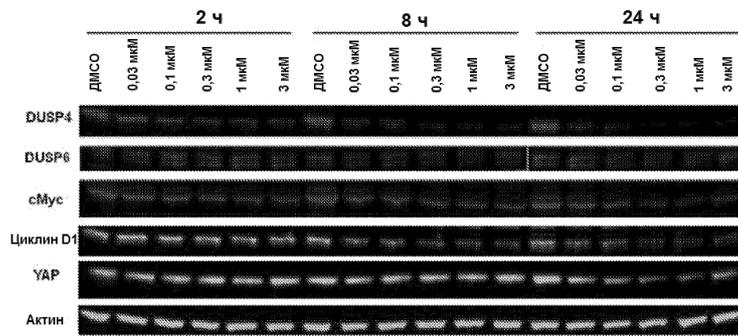
19. Способ по п.18, где мутация EGFR представляет собой одну или более из EGFR E282K, G719S, R753S или V1011M.

20. Способ по п.14, где рак дополнительно характеризуется мутацией BRAF.

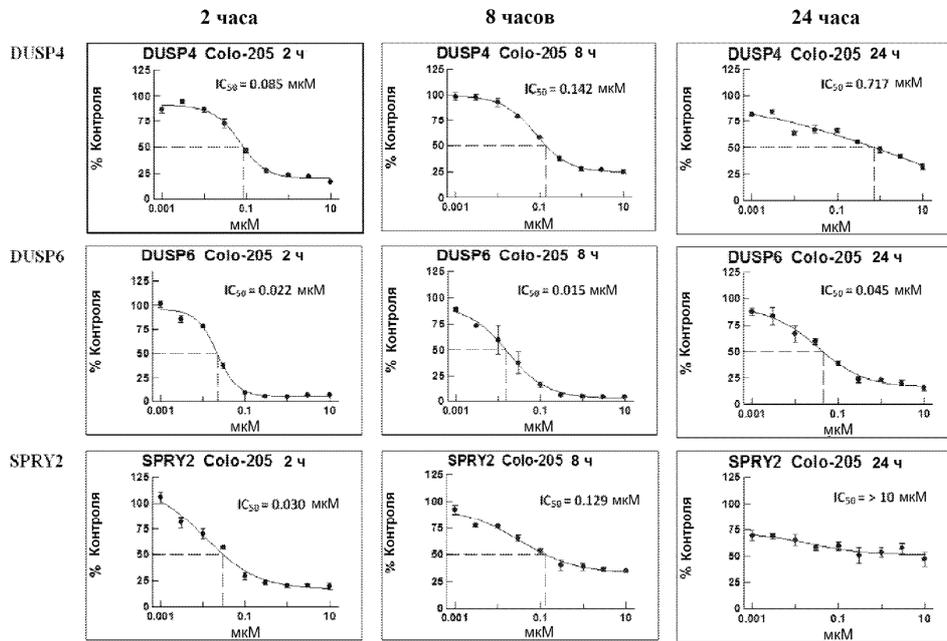
21. Способ по п.20, где мутация BRAF включает мутацию BRAF V660E, BRAF T119S или BRAF G596R.



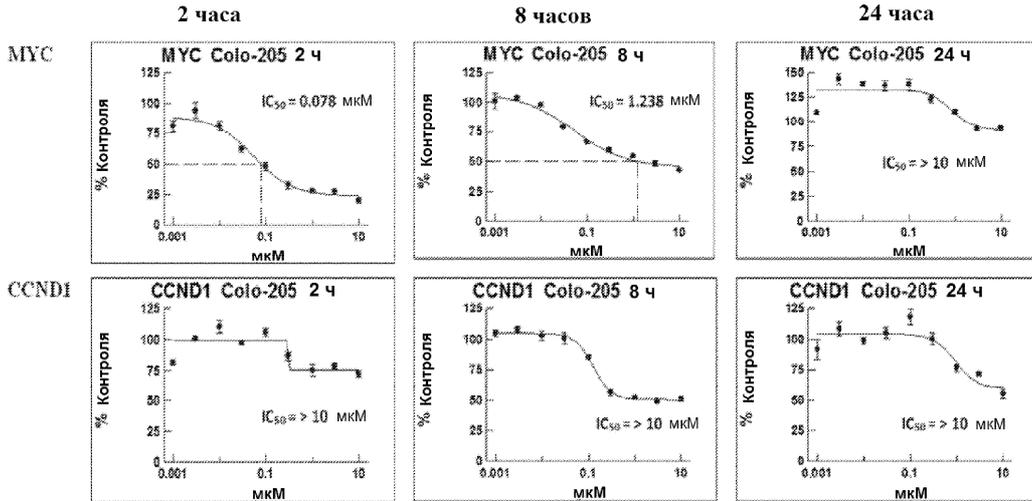
Фиг. 1



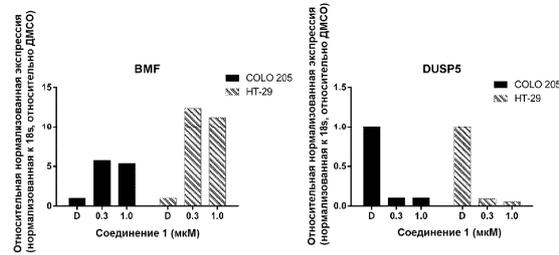
Фиг. 2A



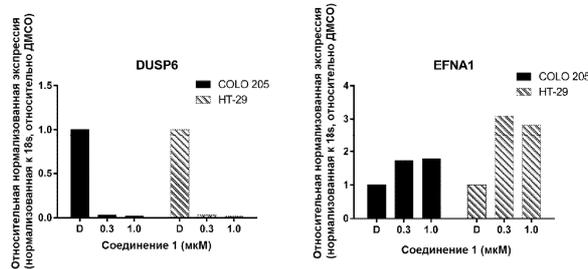
Фиг. 2B



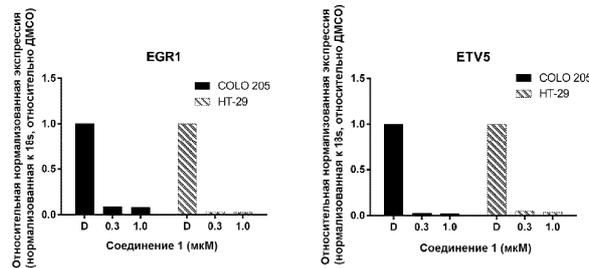
Фиг. 2С



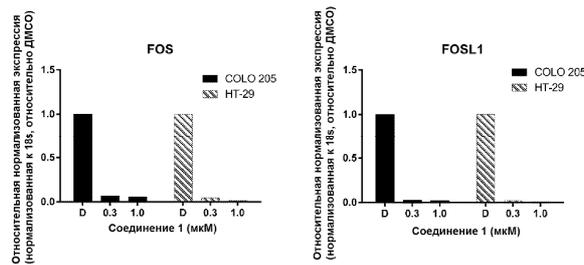
Фиг. 2D



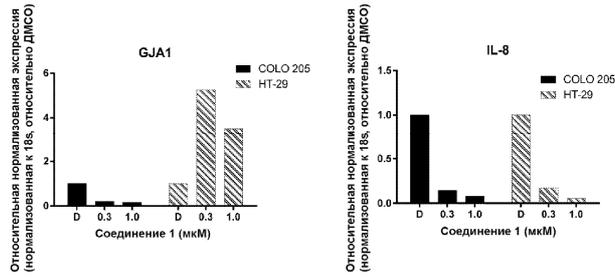
Фиг. 2E



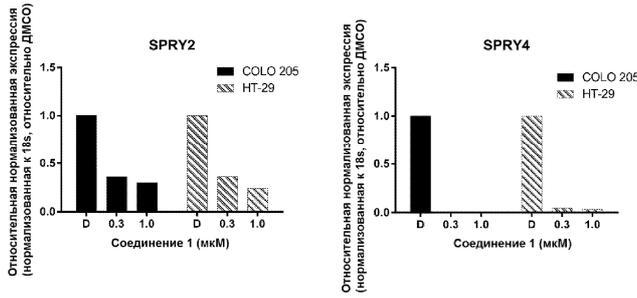
Фиг. 2F



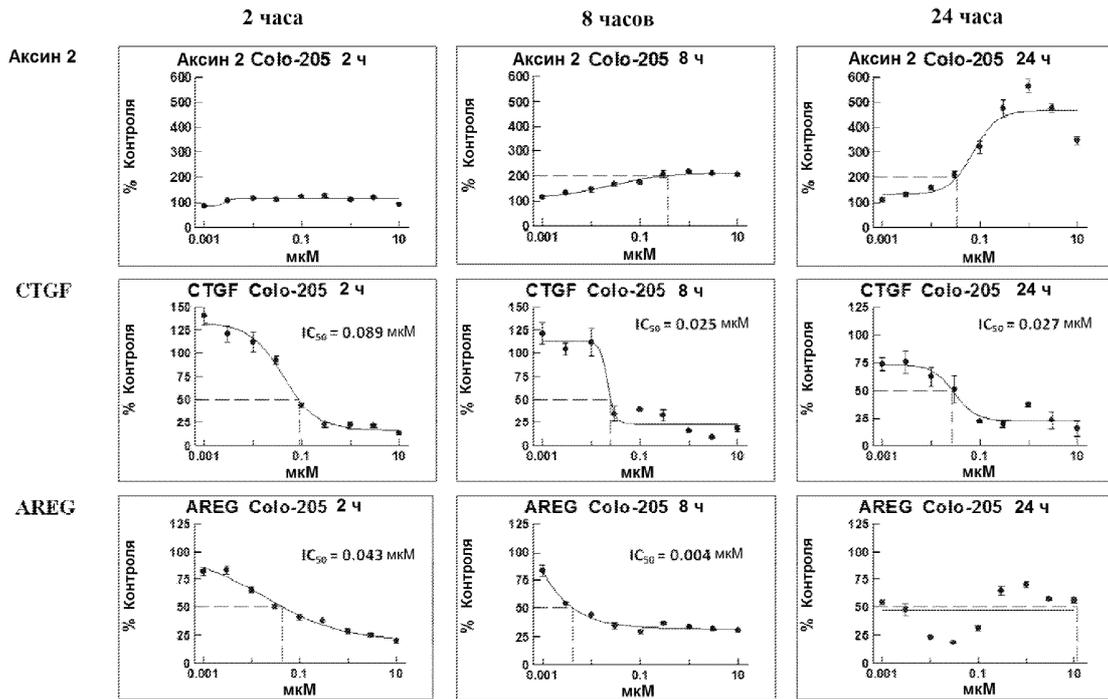
Фиг. 2G



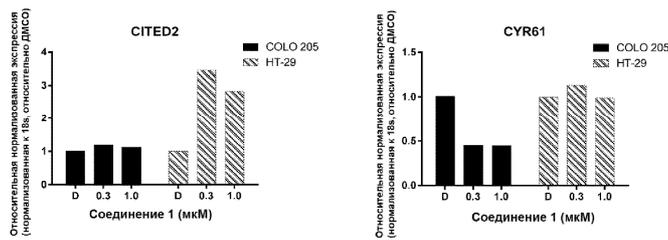
Фиг. 2Н



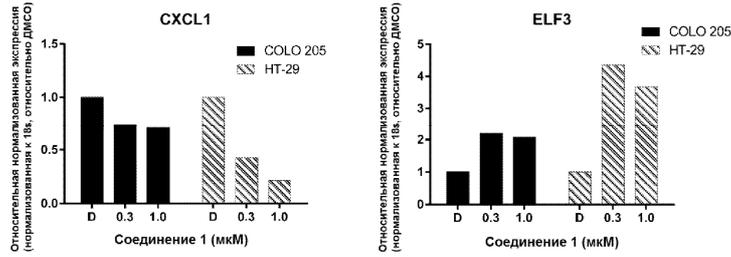
Фиг. 2I



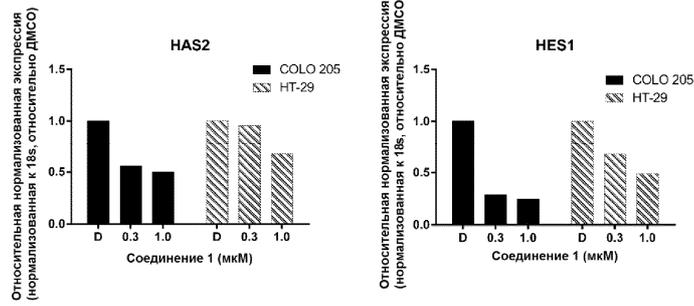
Фиг. 3А



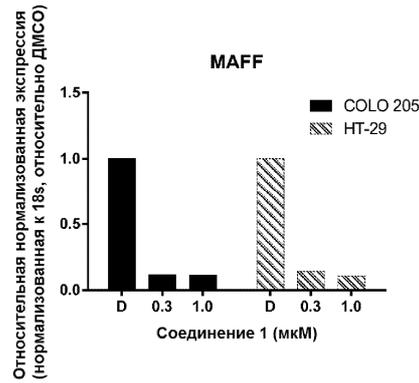
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 3D



Фиг. 3Е

НОР62 (НМРЛ)

Каркас-299 (лимфома)

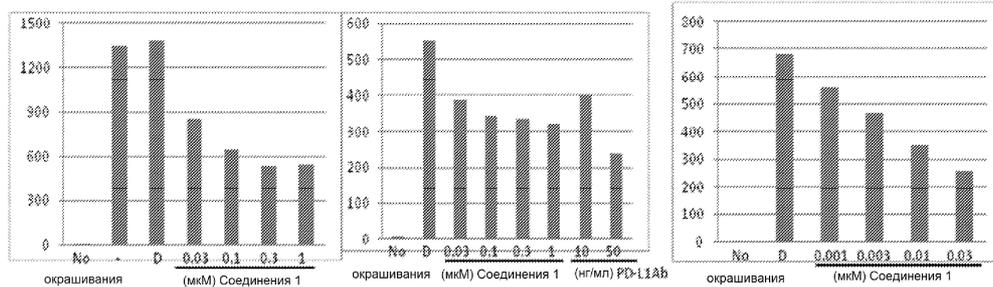
Lox-IMVI (меланома)

❖ Общий PD-L1 (вестерн-блоттинг)

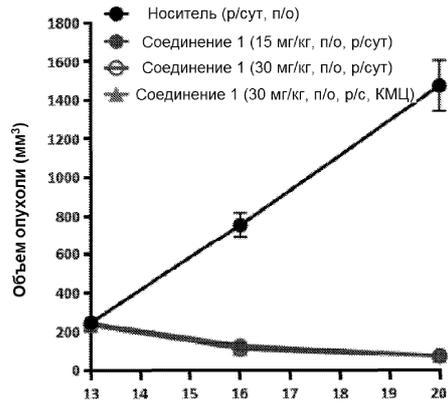


Фиг. 4А

❖ PD-L1 на клеточной поверхности (FACS)

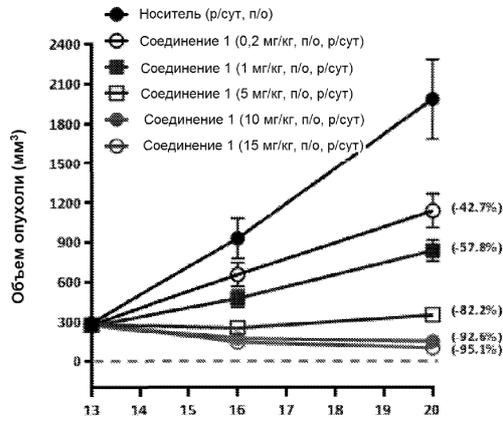


Фиг. 4В



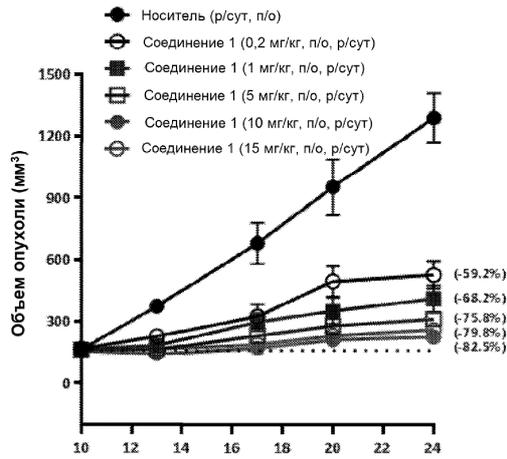
Дней после прививки

Фиг. 6



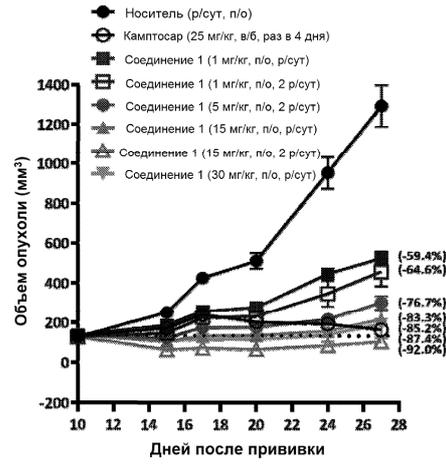
Дней после прививки

Фиг. 7

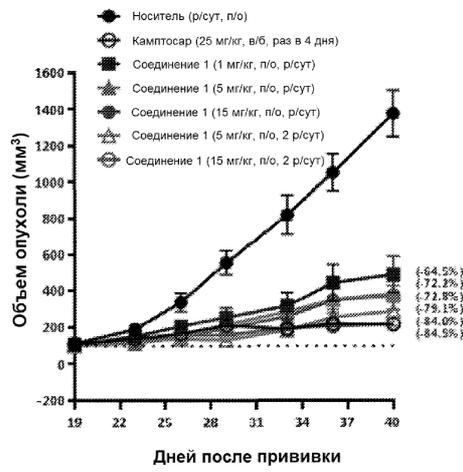


Дней после прививки

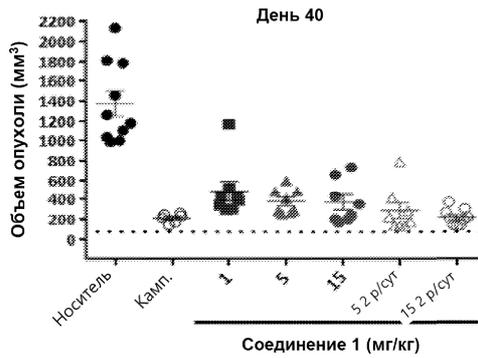
Фиг. 8



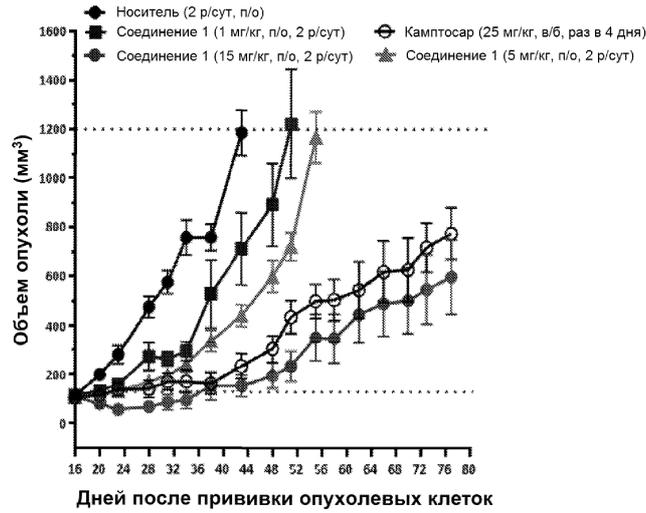
Фиг. 9



Фиг. 10А

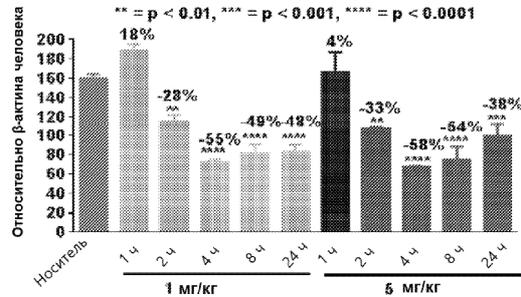


Фиг. 10В



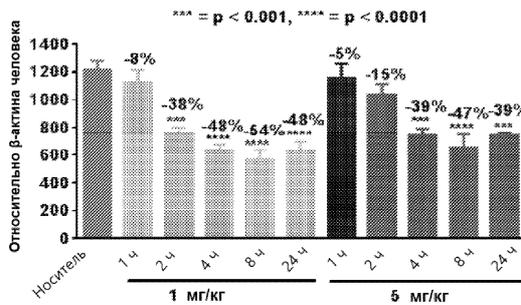
Фиг. 11

мРНК DUSP6



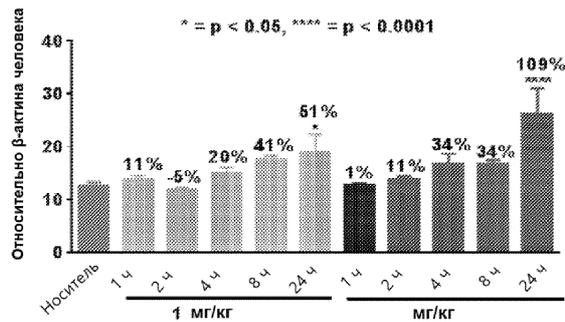
Фиг. 12А

мРНК cMyc

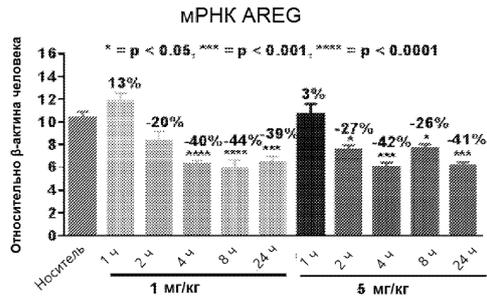


Фиг. 12В

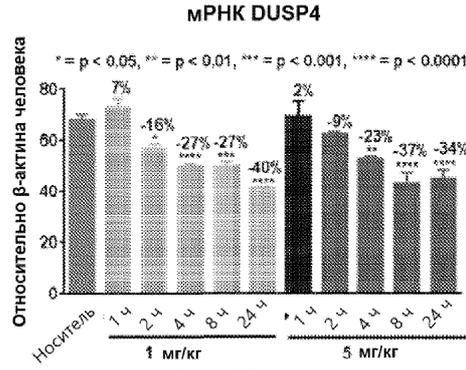
мРНК аксина 2



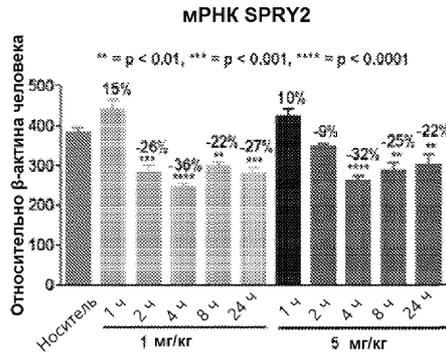
Фиг. 12С



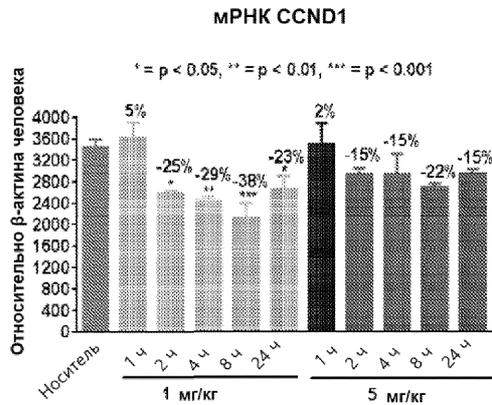
Фиг. 12D



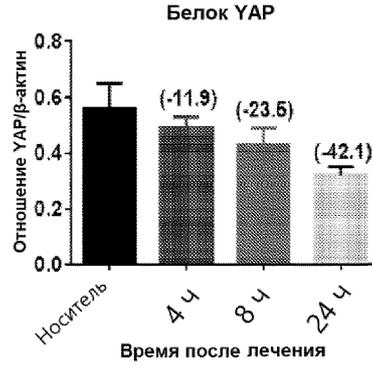
Фиг. 13А



Фиг. 13В

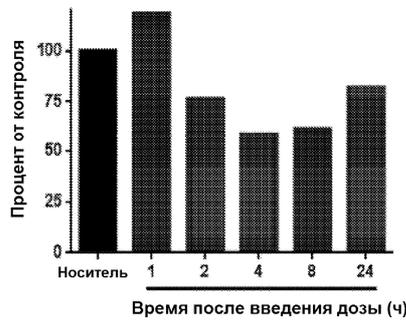


Фиг. 13С



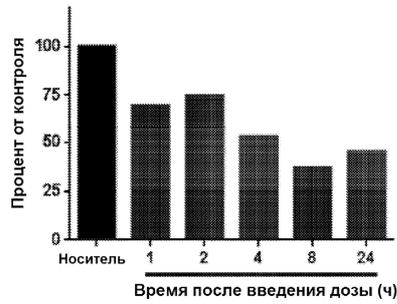
Фиг. 13D

р-RSK в лизатах опухоли KPP-PDX (146) от мышей, получавших лечение Соединением 1 (1 мг/кг)



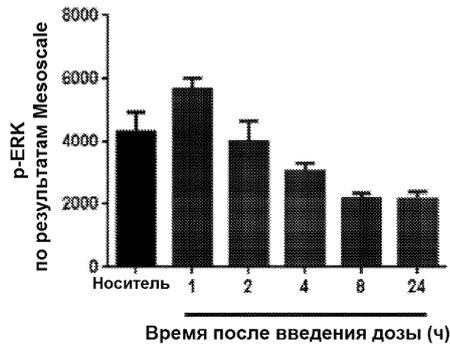
Фиг. 14А

р-RSK в лизатах опухоли KPP-PDX (146) от мышей, получавших лечение Соединением 1 (5 мг/кг)



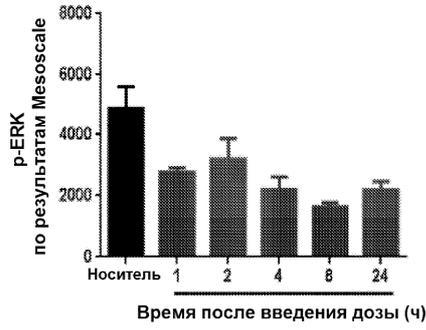
Фиг. 14В

р-ERK в лизатах опухоли KPP-PDX (146) от мышей, получавших лечение Соединением 1 (1 мг/кг)

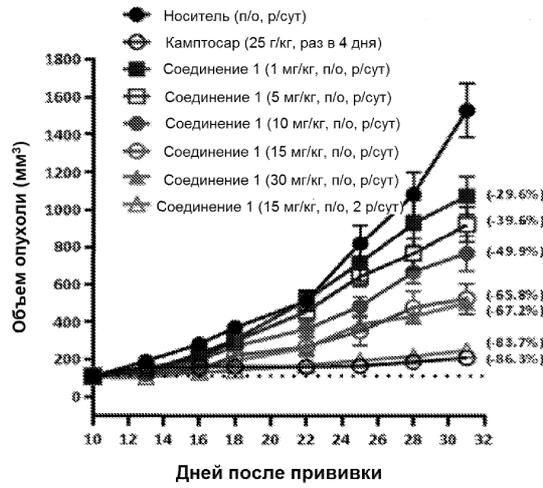


Фиг. 14С

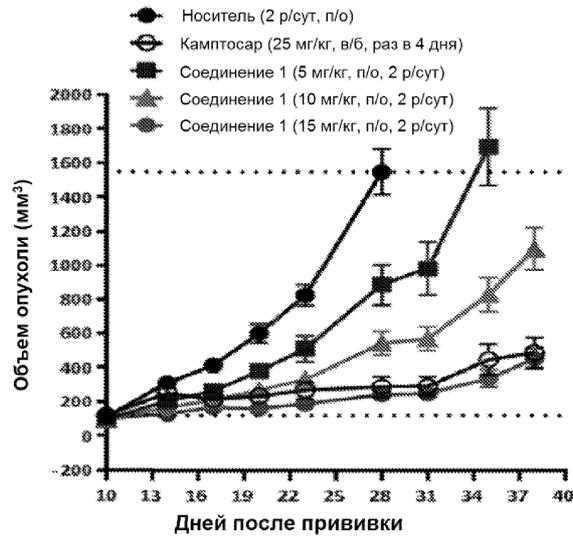
p-ERK в лизатах опухоли KPP-PDX (146) от мышей, получавших лечение Соединением 1 (5 мг/кг)



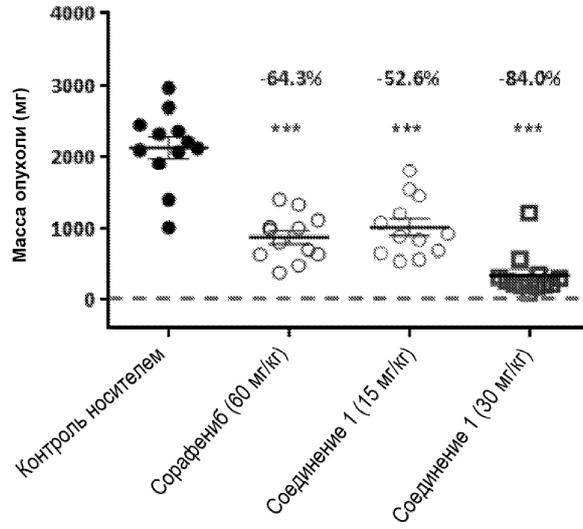
Фиг. 14D



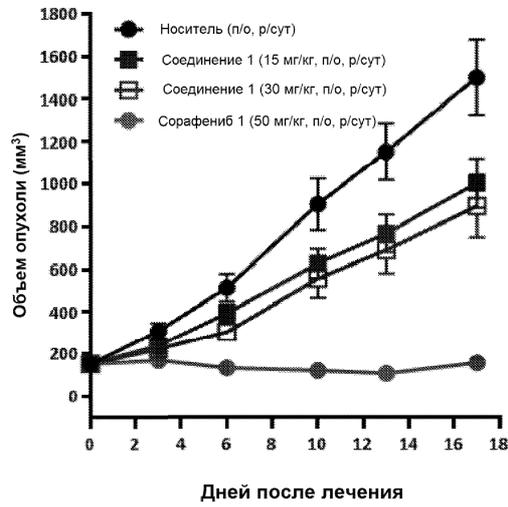
Фиг. 15А



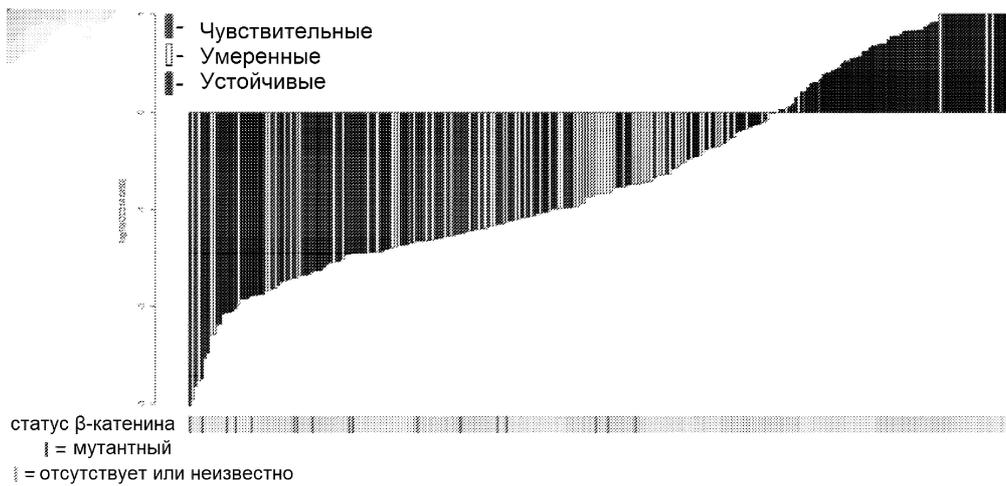
Фиг. 15В



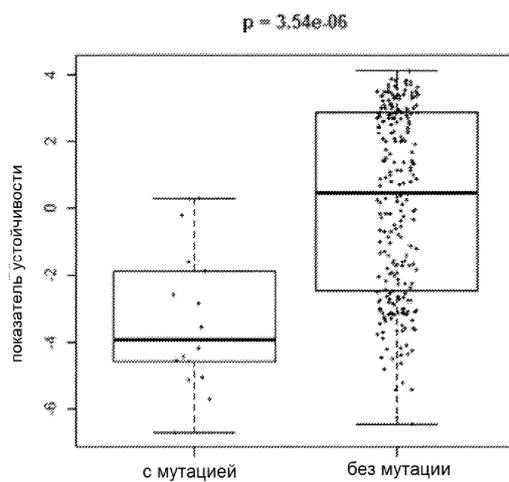
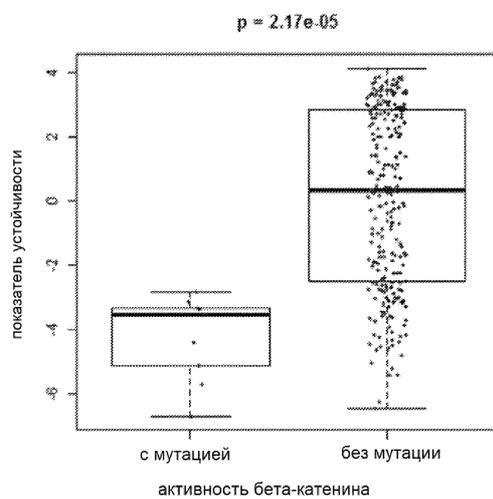
Фиг. 16



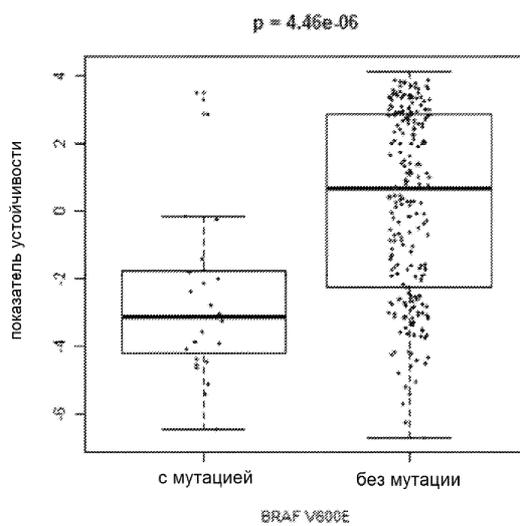
Фиг. 17



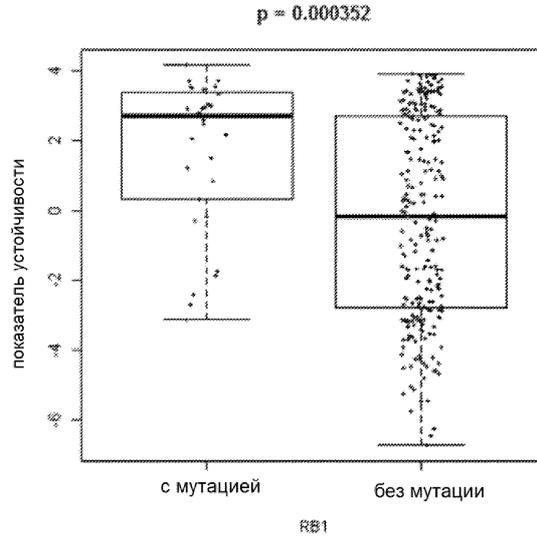
Фиг. 18

СТИНВ1
Фиг. 19А

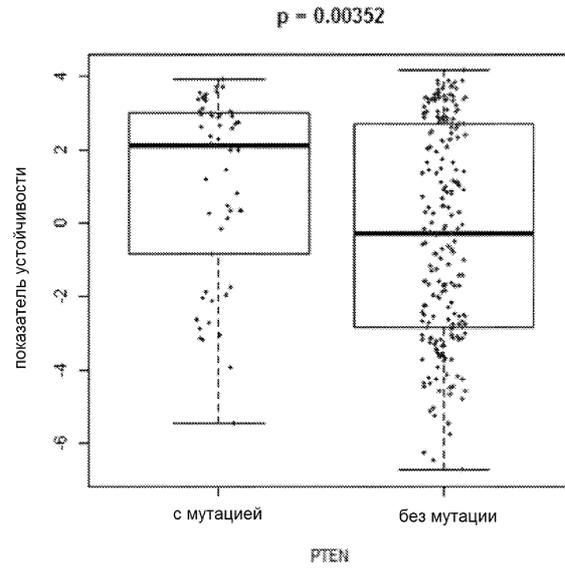
Фиг. 19В



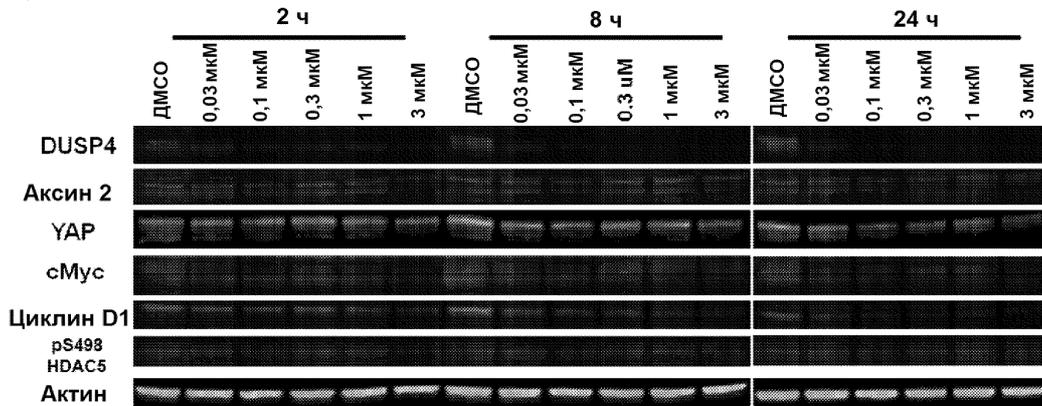
Фиг. 19С



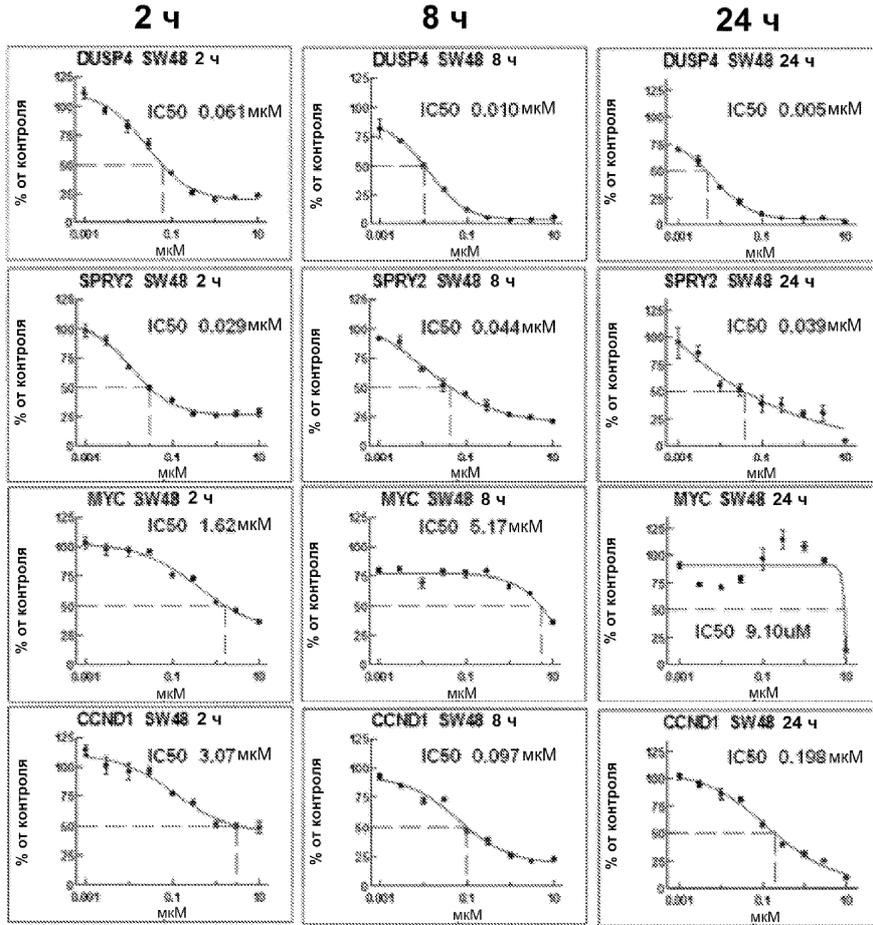
Фиг. 19D



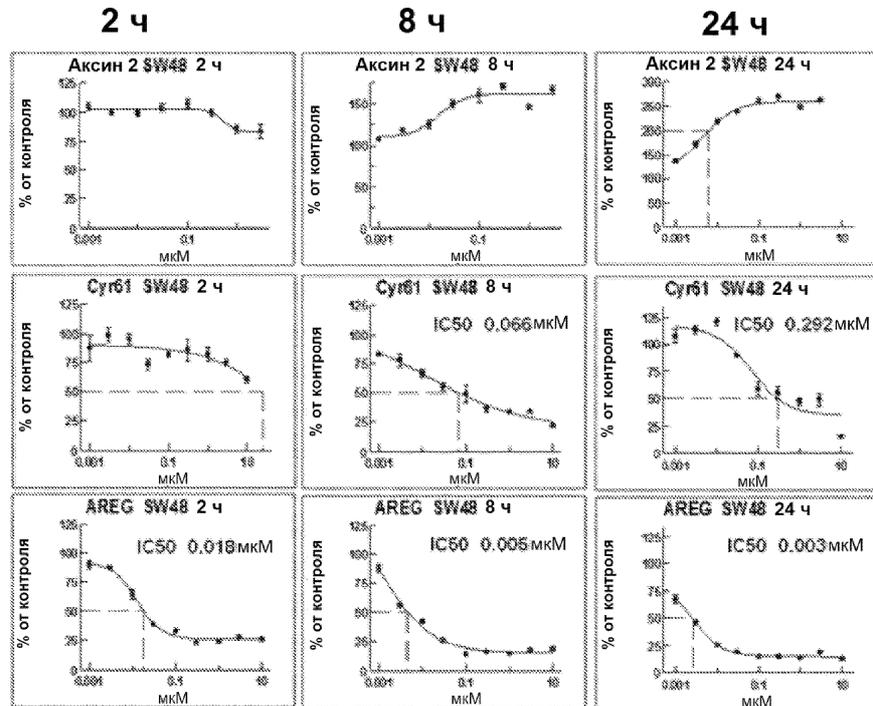
Фиг. 19E



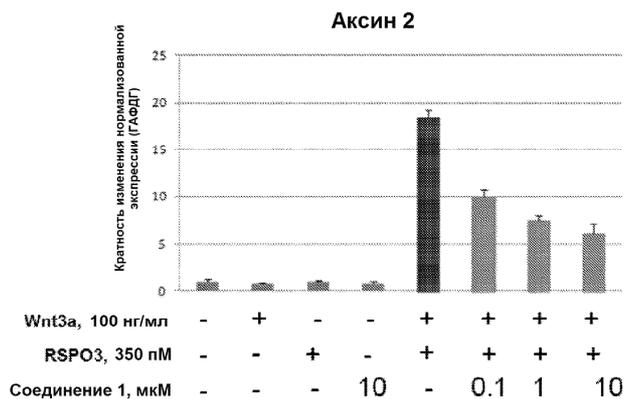
Фиг. 20



Фиг. 21А



Фиг. 21В

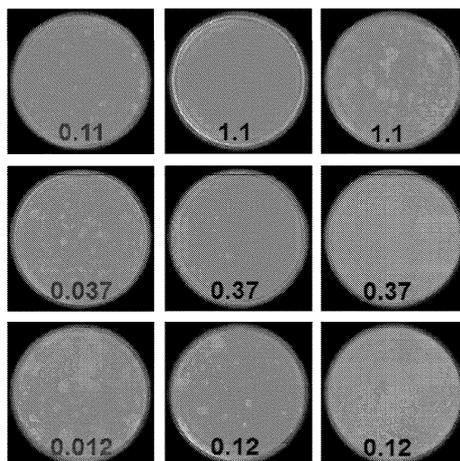


Экспрессия гена в клетках бронхиального эпителия человека через 24 ч

Фиг. 22

SW48 (КРР бета-катенин, EGFR)

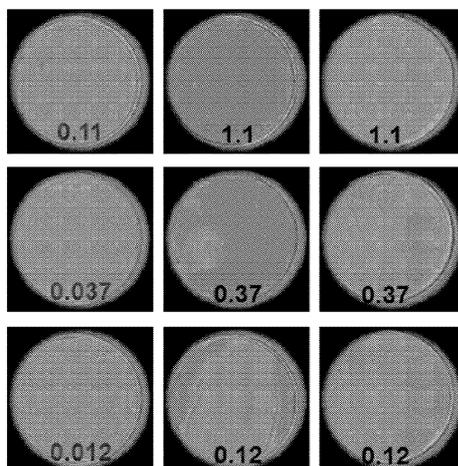
МЕKi(Тра) Соединение 1 GDC0994 мкМ



Фиг. 23А

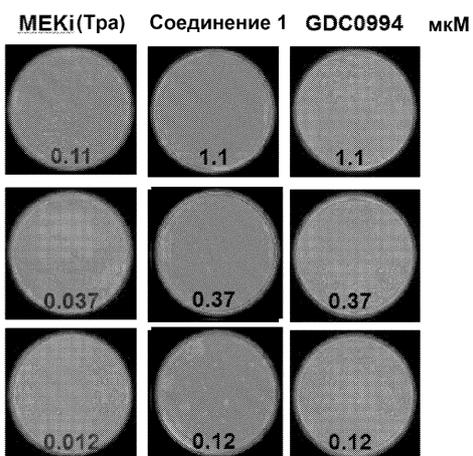
HCT-116(КРР бета-катенин, KRAS, PIK3CA)

МЕKi(Тра) Соединение 1 GDC0994 мкМ



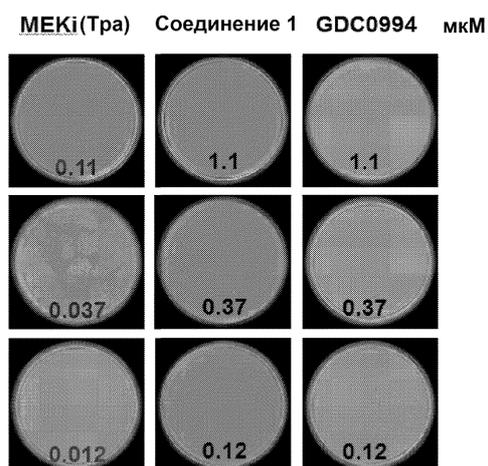
Фиг. 23В

AGS (желудка бета-катенин, KRAS)



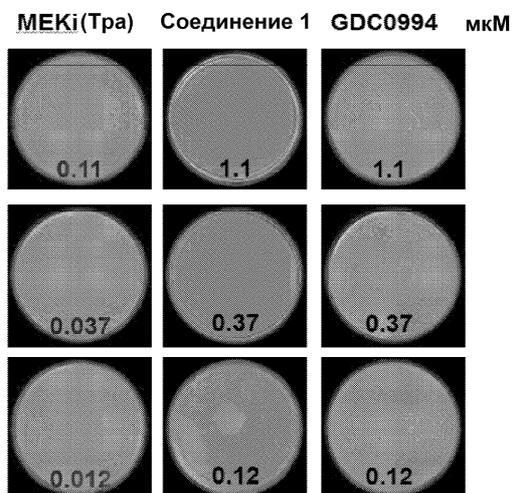
Фиг. 23С

Нер3В(ГКК бета-катенин-активный)

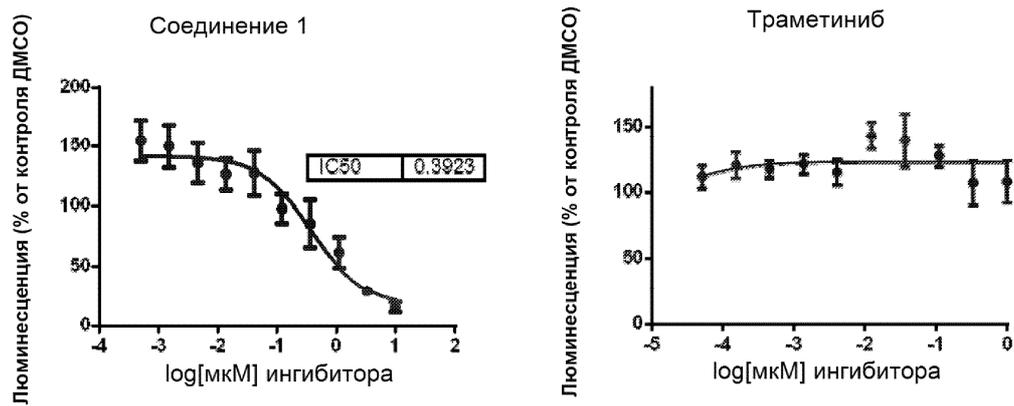


Фиг. 23D

AGS, устойчивые к траметинибу



Фиг. 24



Фиг. 25

