(19)

Евразийское патентное ведомство

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.04

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)

- (21) Номер заявки 201891621
- (22) Дата подачи заявки 2017.01.11

# (54) ИНГИБИТОР АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКСТАЗИИ И RAD3-POДСТВЕННОГО БЕЛКА (ATR) И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО ЛИПОСОМНЫЕ КОМПОЗИЦИИ

- (31) 62/277,262; 62/420,258; 62/444,172
- **(32)** 2016.01.11; 2016.11.10; 2017.01.09
- (33) US
- (43) 2018.12.28
- (86) PCT/US2017/012939
- (87) WO 2017/123588 2017.07.20
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец: СЕЛАТОР ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)
- (72) Изобретатель: Драммонд Дэрил С., Гэн Болинь, Кирпотин Дмитри Б., Типпараджу Суреш К., Кошкарёв Александер, Алкан Озан (US)
- (74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)

(56) Charrier et al.: "Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Protein Kinase as Potential Anticancer Agents", Journal of Medicinal Chemistry, 17 March 2011 (17.03.2011), vol.54, p. 2320-2330,

abstract, p. 2324, 2325 WO-A1-2016004043 US-B2-8999632 US-B2-8841308 US-A1-20130184292 US-A1-20130089626 US-A1-2015359797

(57) Настоящее изобретение относится к ингибитору атаксии-телеангиэкстазии и Rad3-родственного белка (ATR), представляющему собой соединение формулы (Ia) или его фармацевтически приемлемую соль, включая соединения, используемые по указанному назначению, а также к липосомным композициям, содержащим ингибитор протеинкиназы ATR. Данные композиции пригодны для лечения рака.





# Область техники изобретения

Данное описание относится к ингибиторам атаксии-телеангиэкстазии и Rad3-родственного белка (ATR), включая соединения, используемые по указанному назначению, а также к липосомным композициям, содержащим ингибитор протеинкиназы ATR.

#### Уровень техники

Атаксии-телеангиэкстазии и Rad3-родственная киназа (ATR) представляют собой сериновую/треониновую протеинкиназу, которая, как полагают, может участвовать в процессах репарации повреждений клеточной ДНК и сигналинге клеточного цикла. Киназа ATR действует с киназой ATM (мутировавшая при атаксии-телеангиэкстазии) и другими белками для управления реакцией клетки на повреждение ДНК, обычно называемой ответом на повреждение ДНК (DDR). Считается, что DDR стимулирует репарацию ДНК, способствует выживаемости и останавливает прохождение цикла деления клеток путем активации контрольных точек клеточного цикла, которые предоставляют временной промежуток для репарации. Без DDR клетки намного более чувствительны к повреждению ДНК и легко гибнут из-за сайтов повреждений ДНК, индуцированных эндогенными клеточными процессами, такими как репликация ДНК, или экзогенными повреждающими ДНК-агентами, обычно применяемыми в противораковой терапии.

Показано, что нарушение функционирования ATR (например, путем удаления генов) способствует гибели раковых клеток как в отсутствии, так и в присутствии повреждающих ДНК-агентов. Мутации ATR связали с раковыми заболеваниями желудка и эндометрия, и они ведут к увеличению чувствительности к ионизирующей радиации и пропусканию контрольных точек клеточного цикла. ATR необходима для обеспечения жизнеспособности соматических клеток, и показано, что удаление ATR приводит к нарушению ответов в контрольных точках на повреждения и гибели клеток. См. Cortez et al. Science 294: 1713-1716 (2001). ATR также необходима для стабильности ломких сайтов, а низкая экспрессия ATR у пациентов с синдромом Секкеля приводит к увеличению вероятности хромосомного разрыва после стресса репликации. См. Casper et al., Ат. J. Hum. Genet 75: 654-660 (2004). Комплекс репликативного белка A (RPA) рекрутирует ATR и его взаимодействие с белком ATRIP по сайтам повреждения ДНК, а сама по себе ATR опосредует активацию каскада передачи сигнала СНК1. См. Zou et al. Science 300: 1542-1548 (2003). ATR, как и родственная ей киназа ATM контрольных точек, фосфорилирует RAD17 в начале каскада, что является критически важным для передачи сигнала контрольной точки в клетках с поврежденной ДНК. См. Вао et al. Nature 411: 969-974 (2001). Считается, что ATR особенно важна для эмбриона млекопитающего в раннем возрасте для репликации ДНК с неполной смысловой последовательностью и предотвращения митотической катастрофы.

Тем не менее, поскольку повреждающие ДНК химиотерапевтические агенты и терапия ионизирующей радиацией (IR) обеспечила первоначальную терапевтическую полезность онкологическим пациентам, существующие виды лечения потеряли клиническую эффективность (например, вследствие ответов опухолевых клеток на повреждение ДНК). Показано, что влияния ингибитора ATR in vivo и повреждающего ДНК-агента дают определенную надежду для селективного лечения раковых клеток по сравнению с нормальными клетками, в частности, при лечении опухолевых клеток, дефицитных по управлению в контрольной точке G1 (что, в отношении выживаемости больше может зависеть от ATR).

Сохраняется необходимость в разработке активных и селективных видов терапии для доставки ингибиторов ATR для лечения рака либо в виде отдельных агентов, либо как часть комбинированных видов терапии (например, в сочетании с химиотерапией и/или радиационной терапией).

## Краткое описание сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили новые химические соединения, пригодные для ингибирования атаксии-телеангиэктазии и Rad3-родственной киназы (ATR) и лечения рака, и липосомные композиции определенных ингибиторов протеинкиназы ATR, обладающие требуемыми свойствами (например, увеличенным периодом полувыведения из кровообращения и эффективностью для лечения опухолей). В частности, настоящее изобретение основано на обнаружении определенных новых соединений для ингибирования протеинкиназы ATR, а также на увеличенных периодах полувыведения из плазмы и улучшенной противоопухолевой эффективности определенных липосомных композиций, ингибирующих протеинкиназу ATR соединений.

В первом варианте реализации настоящее изобретение относится к ингибитору протеинкиназы атаксии-телеангиэкстазии и Rad3-родственного белка (ATR), представляющему собой соединение формулы (Ia) или его фармацевтически приемлемую соль



где R' представляет собой NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо представляют собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил. В другом варианте настоящее изобретение относится к соединению формулы 5 или его фармацевтически приемлемой соли



В ещё одном варианте настоящее изобретение относится к соединению формулы 6 или его фармацевтически приемлемой соли



В ещё одном варианте настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей ингибитор протеинкиназы ATR, инкапсулированный в липосому, где ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение A или его фармацевтически приемлемую соль



В ещё одном варианте настоящее изобретение относится к липосомной композиции, содержащей ингибитор протеинкиназы ATR, инкапсулированный в липосому, где ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль



где R представляет собой

iv)

<sup>R1</sup>, где A<sup>1</sup> либо отсутствует, либо представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил и R<sup>1</sup> представляет i) собой С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>-алкиламино;

ii) -N(H) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил)-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо означают C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил; iii) -(G)-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо означают C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, где G означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил и где G может быть дополнительно замещен  $C_1$ - $C_4$ -алкилом; или

 $R^{d}$ , где  $R^{c}$  и  $R^{d}$  каждый независимо означают  $C_{1}$ - $C_{4}$ -алкил.

В предпочтительном варианте липосомная композиция содержит ингибитор протеинкиназы АТР, который представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из



В предпочтительном варианте липосомная композиция содержит ингибитор протеинкиназы ATR, который представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из

039513



В предпочтительном варианте липосомная композиция включает холестерин.

В предпочтительном варианте липосома в составе липосомной композиции содержит гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (ГСФХ) и холестерин.

В другом предпочтительном варианте липосома в составе липосомной композиции дополнительно содержит ПЭГ(2000)-дистеароилглицерин (ПЭГ-ДСГ).

В более предпочтительном варианте липосома содержит ГСФХ, холестерин и ПЭГ-ДСГ в молярном соотношении 3:2:0,15.

В другом более предпочтительном варианте липосома содержит один или более фосфолипидов.

В другом более предпочтительном варианте липосома содержит 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДСФХ).

В другом предпочтительном варианте липосомная композиция по настоящему изобретению содержит ингибитор протеинкиназы ATR, представляющий собой соединение 1



#### Соединение 1

В предпочтительном варианте липосомная композиция по настоящему изобретению имеет период полувыведения из плазмы по меньшей мере 5 ч у мышей.

В предпочтительном варианте ингибитор протеинкиназы ATR в составе липосомной композиции представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном варианте ингибитор протеинкиназы ATR в составе липосомной композиции представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

Соединения-ингибиторы ATR и/или их липосомные составы, описанные в данном документе, могут применяться для терапии и в способах лечения. В некоторых случаях терапия представляет собой лечение ракового заболевания. При использовании в качестве терапии липосомная композиция может применяться в схеме лечения с одним или более другими соединениями или композициями (например, в комбинации с иринотекановым липосомным составом, таким как MM-398).



# Иринотекан

Введение липосомной композиции с одним или более другими соединениями или композициями может происходить одновременно, отдельно или последовательно. Такое одно или более других соединений или композиций могут представлять собой дополнительные терапевтические средства, например дополнительные противораковые агенты, или могут быть соединениями, которые предназначены для облегчения негативных побочных эффектов терапевтических агентов.

## Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена первая схема химической реакции, пригодной для производства определенных, описанных в данном документе соединений.

На фиг. 2 изображена вторая схема химической реакции, пригодной для производства определенных, описанных в данном документе соединений.

На фиг. З изображена третья схема химической реакции, пригодной для производства определенных, описанных в данном документе соединений.

На фиг. 4 изображена четвертая схема химической реакции, пригодной для производства определенных, описанных в данном документе соединений.

На фиг. 5 изображен график, демонстрирующий фармакокинетические параметры в крови липосомальных ингибиторов ATR, как обсуждается в примере 8.

На фиг. 6 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомального соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата MS751, как описано в примере 9А.

На фиг. 7 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомаль-

ного соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата СЗЗА, как описано в примере 9А.

На фиг. 8 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомального соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата СЗЗА, в соответствии с примером 9А.

На фиг. 9 изображен график, демонстрирующий переносимость липосомального соединения А в комбинации с ММ-398 на цервикальной модели MS751 в соответствии с примером 9А.

На каждой из фиг. 10А и 10В изображен график, демонстрирующий эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиных моделях ксенотрансплантатов NCI-H2170 (фиг. 10А) или DMS-114 (фиг. 10В), обсуждаемых в примере 10.

На каждой из фиг. 11А и 11В изображен график, демонстрирующий кривые выживаемости Каплана-Мейера, представляющие эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиной модели ксенотрансплантата NCI-H2170 (фиг. 11А) и DMS-114 (фиг. 11В), как обсуждается в примере 10.

На каждой из фиг. 12А и 12В изображен график, демонстрирующий переносимость липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиной модели ксенотрансплантата NCI-H2170 (фиг. 12А) или DMS-114 (фиг. 12В).

На фиг. 13А и 13В изображены графики, демонстрирующие эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиных моделях ксенотрансплантатов Calu-6 (фиг. 13А) или COLO-699 (фиг. 13В), обсуждаемых в примере 11.

На фиг. 14А изображен график, иллюстрирующий уничтожение клеток in vitro монотерапией соединениями 5 и 6 на наборе линий клеток рака легкого.

На фиг. 14В изображен график, иллюстрирующий влияние соединений 5 и 6 в комбинации с тремя химиотерапевтическими агентами (карбоплатин, гемцитабин, соединение В).

На фиг. 15 изображен график, демонстрирующий значения сдвига IC50, измеренные на линии клеток Suml90PT (трижды негативный рак молочной железы, TNBC), для ингибирующего протеинкиназу ATR соединения 6 примера 2 с различными концентрациями соединения В и без него.

На фиг. 16А изображен график, демонстрирующий значения сдвига IC50 комбинации ингибирующего протеинкиназу ATR соединения 6 примера 2, измеренные на линии раковых клеток MDA-MB-453 TNBC.

На фиг. 16В изображен график, демонстрирующий значения сдвига IC50 комбинации ингибирующего протеинкиназу ATR соединения A, измеренные на линии раковых клеток MDA-MB-453 TNBC.

На фиг. 17 изображены результаты вестерн-блот анализа, полученные на клетках DMS-114 рака легкого, которых подвергали воздействию либо гемцитабина [16 нМ], либо только ингибитора ATR (соединение A или соединение 5 [1 мкМ]) или их комбинации in vitro.

На фиг. 18А и 18В изображены результаты анализа гибели и роста клеток, выполненного с комбинированием соединения А и гемцитабина при различных концентрациях на клетках U2OS. Данные результаты сравнивают с предыдущим прогнозом роста и гибели клеток для комбинации этих двух соединений (фиг. 18А). Количество живых и апоптических клеток также определяют для ряда концентраций соединения А (1 мкМ) и гемцитабина (0,04 мкМ) на клетках USO2 (фиг. 18В).

На фиг. 19 изображено исследование соединения А самостоятельно и в комбинации с SN38 для ряда концентраций (соответственно 1 и 0,2 мкМ) на нескольких линиях клеток рака легкого (NCI-H520 и NCI-H596) и клетках U2OS с отслеживанием количества клеток с течением времени.

На фиг. 20 изображен график, иллюстрирующий влияние соединения А и SN38 в комбинации и самостоятельно на линии клеток MS751 рака шейки матки.

На фиг. 21А-С демонстрируются влияния комбинирования соединения А или соединения 5 с гемцитабином. На фиг. 21А изображена карта интенсивностей, иллюстрирующая влияние комбинирования соединения А или соединения 5 с гемцитабином при различных концентрациях на линиях клеток U2OS, H358 и A549. Показаны микроскопические изображения клеток, обработанных набором концентраций соединения 5 и гемцитабина или соединения А и гемцитабина для этих клеток (фиг. 21В). Показаны также результаты анализов пролиферации клеток USO2 и H358 с рядом концентраций (фиг. 21С).

На фиг. 22А и 22В иллюстрируют кривые роста клеток А549 с соединением А или соединением 5 в комбинации с SN38 (фиг. 22А) или самостоятельно (фиг. 22В).

На фиг. 23 показаны значения IC50 (мкМ) для нескольких линий клеток с использованием ряда концентраций гемцитабина с различными концентрациями соединения А или соединения 5.

На фиг. 24 показаны сводные данные по линиям клеток рака легкого, которые восприимчивы к соединению А или соединению 5 в комбинации с гемцитабином или SN38.

На фиг. 25А и 25В показаны различные ингибиторы ATR, исследуемые на способность ингибировать ATR (целевая мишень) и ATM (нецелевая мишень). Ингибирование выражено как IC50 в нМ (фиг. 25А). С соединением А или соединением 5 исследуют также дополнительные "нецелевые" киназы (фиг. 25В).

На фиг. 26А-F изображены результаты для целевых мишеней с соединением А или соединением 5 на клетках А549 рака легкого (фиг. 26А и 26В), клетках Н23 рака легкого (фиг. 26С и 26D) и клетках DMS-114 (фиг. 26E и 26F). Фосфорилирование S345 CHK1 - показатель ингибирования ATR - измеряют вестерн-блот анализом. Каждое соединение при этом применяется при фиксированной концентрации гемцитабина.

На фиг. 27А и 27В изображены результаты дополнительного целевого анализа на линиях клеток HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC и DMS-114. С диапазоном концентраций соединения А или соединения 5 используют набор концентраций SN38. Методом вестерн-блоттинга исследуют и измеряют различные параметры целевой активности (фиг. 27А и 27В).

На фиг. 28 изображены профили стадий клеточного цикла клеток SUM149 через 24 ч после добавления SN38 и соединения А или соединения 5.

На фиг. 29 изображены модели ксенотрансплантата легкого DMS-114, используемые для измерения воздействий лс-соединения А или лс-соединения 5 в комбинации с MM-398. С двумя разными дозировками соединения А или соединения 5 (20 или 80 мг/кг) используют набор дозировок MM-398 (5 мг/кг). Воздействия обработки анализируют измерением уровней фосфорилирования S345 CHK1.

На фиг. 30А-С иллюстрируются воздействия лс-соединения А с ММ-398 на линию клеток SUM-149. Воздействия обработки анализируют измерением уровней фосфорилирования RPA2 (фиг. 30A), DNAPK, CHK1 и уH2AX (фиг. 30B). Лс-соединение 5 также исследуют без комбинации с MM-398 (фиг. 30C).

На фиг. 31 изображен график, демонстрирующий эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиной модели ксенотрансплантата SUM-149.

На фиг. 32 изображен график, демонстрирующий переносимость липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиных моделях ксенотрансплантата SUM-149.

На фиг. 33 показаны базальные уровни различных ФД-маркеров, связанных с механизмом ответа на повреждение ДНК, количественно определяемые вестерн-блотом на наборе линий клеток.

На фиг. 34 показана схематическая иллюстрация пути расчета интегрального показателя для каждой лунки в динамическом анализе жизнеспособности клеток.

На фиг. 35 показаны корреляция базальной экспрессии белка MRE11 (количественно определяемая вестерн-блотом) и интегрального показателя и измерение динамической жизнеспособности клеток среди линий клеток рака легкого, подверженных воздействию ингибирующего ATR соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 36 показаны корреляция базальной экспрессии белка ATM (количественно определяемая вестерн-блотом) и интегрального показателя и измерение динамической жизнеспособности клеток среди линий клеток рака легкого, подверженных воздействию ингибирующего ATR соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 37 показаны корреляция базальной экспрессии белка NBS (количественно определяемая вестерн-блотом) и интегрального показателя и измерение динамической жизнеспособности клеток среди линий клеток рака легкого, подверженных воздействию ингибирующего ATR соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 38 показаны корреляция базальной экспрессии белка NBS (количественно определяемая вестерн-блотом) и интегрального показателя и измерение динамической жизнеспособности клеток среди линий клеток рака легкого с функциональным нарушением p53, подверженных воздействию ингибирующего ATR соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 39 показаны корреляция базальной экспрессии белка NBS (количественно определяемая вестерн-блотом) и интегрального показателя и измерение динамической жизнеспособности клеток среди линий клеток рака легкого с функциональным нарушением p53, подверженных воздействию ингибирующего ATR соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 40А-F показана кратность изменения фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток NCIH1299 после воздействия ATR-ингибирования и/или SN38.

На фиг. 41А-F показана кратность изменения фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток NCIH460 после воздействия ATR-ингибирования и/или SN38.

На фиг. 42А-F показана кратность изменения фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток DMS114 после воздействия ATR-ингибирования и/или SN38.

На фиг. 43А-F показана кратность изменения фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток HCC70 после воздействия ATR-ингибирования и/или SN38.

На фиг. 44А-F показана кратность изменения фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток MDAMB468 после воздействия ATR-ингибирования и/или SN38.

На фиг. 45 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток А549 после 6 или 18 ч воздействия АТR-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 46 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток NCIH23 после 6 или 18 ч воздействия ATR-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 47 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток DMS114 после 6 или 18 ч воздействия ATR-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 48 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток U2OS после 6 или 18 ч воздействия АТК-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 49 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток NCIH460 после 6 или 18 ч воздействия ATR-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 50 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на линии раковых клеток HCC827 после 6 или 18 ч воздействия ATR-ингибирования и/или гемцитабина.

На фиг. 51 показаны результаты вестерн-блотов фармакодинамических маркеров на наборе линий клеток колоректального рака после 18 ч воздействия соединения 5 и/или SN38.

На фиг. 52 показано нормализированное количественное определение уровней фосфорилированного Chk1 на наборе линий клеток колоректального рака после 18 ч воздействия соединения 5 и/или SN38 (для каждой линии клеток сигнал нормализирован по сигналу в присутствии только SN38).

На фиг. 53 показано нормализированное количественное определение уровней фосфорилированного RPA2 на наборе линий клеток колоректального рака после 18 ч воздействия соединения 5 и/или SN38 (для каждой линии клеток сигнал нормализирован по сигналу в присутствии только SN38).

На фиг. 54 показано нормализированное количественное определение уровней γH2AX на наборе линий клеток колоректального рака после 18 ч воздействия соединения 5 и/или SN38 (для каждой линии клеток сигнал нормализирован по сигналу в присутствии только SN38).

## Подробное описание изобретения

Липосомные составы соединений-ингибиторов протеинкиназы ATR (например, описанные в примере 7) могут обеспечивать такие требуемые фармакокинетические свойства, как увеличенный период полувыведения из плазмы 5 ч или более на мышиной модели, описанной в примере 8. Как правило, липосомы состоят из везикул, содержащих один или более липидных бислоев, заключающих в себе водное содержимое. Липосомные составы обычно содержат липосомы в среде, такой как водное текучее окружение липосомы. Липосомные липиды могут включать в себя амфифильные липидные компоненты, такие как фосфолипиды, например фосфатидилхолины, которые при контакте с водной средой самопроизвольно образуют двухслойные мембраны. Липосомы также могут включать повышающие жесткость мембран компоненты, такие как стерины, например холестерин. В некоторых случаях липосомы также включают липиды, конъюгированные с гидрофильными полимерами, такими как липидные производные полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые могут снижать склонность липосом к агрегации, а также оказывают другие благоприятные воздействия.

Липосомный состав может включать соединение формулы (I), инкапсулированное с полианионом (например, полианионизированным сахаром, таким как сахарозооктасульфонат или подходящий полианионизированный полиол) в однослойной везикуле, образованной из одного или более липосомообразующих липидов (например, гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина (ГСФХ)), холестерина и конъюгированного с полимером липида (например, метокси-поли(этиленгликоль)-1,2-диетеароил-snглицерин (ПЭГ2000-ДСГ)). Липосомообразующий липид предпочтительно содержит один или более фосфолипидов с соотношением фосфолипида(ов) и холестерина, выбранным для обеспечения требуемой степени жесткости липосомной мембраны, в то же время сохраняя просачивание соединения формулы (I) из липосомы.

Как правило, липосомы имеют размер в микронном или субмикронном диапазоне и широко известны благодаря их способности переносить фармацевтические субстанции, включая противораковые лекарственные средства, такие как иринотекан, и изменять их фармацевтические свойства различными благоприятными способами. Способы приготовления и определения параметров фармацевтических липосомных композиций известны в данной области техники (см., например, Lasic D., Liposomes: From physics to applications, Elsevier, Amsterdam, 1993; G. Greroriadis (ed.)., Liposome Technology, 3<sup>rd</sup> edition, vol. 1-3, CRC Press, Boca Raton, 2006; Hong et al., патент США 8147867, который для всех целей включен в данный документ путем ссылки в полном объеме).

В некоторых примерах (например, пример 7) композиции ингибиторов протеинкиназы ATR могут включать липосому, содержащую ингибирующее протеинкиназу ATR соединение, инкапсулированное в липосому с таким полианионом, как полисульфатированный сахар (например, сахарозооктасульфат). Сукрозофат - полностью замещенный сложный эфир серной кислоты и сахарозы - имеет в своей полностью протонированной форме следующую структуру:



Сукрозофат также называют октасульфатом сахарозы или сахарозооктасульфатом (СОС). В данной области техники хорошо известны способы получения сукрозофата в форме различных солей, например солей аммония, натрия и калия (например, патент США 4990610, который включен в данный документ путем ссылки в полном объеме).

Липосомы с ингибиторами протеинкиназы ATR можно получать многостадийным процессом, включающим образование содержащей ТЭА липосомы, с последующим введением соединенияингибитора протеинкиназы ATR (например, соединения А или соединения формулы (I)) внутрь липосомы, по мере того как ТЭА покидает липосому. Например, липосомы с ингибиторами протеинкиназы ATR можно получать процессом, который включает стадии (а) получения липосомы, содержащей триэтиламин (ТЭА) в виде триметиламмониевой соли сукрозофата (ТЭА-СОС); и

(b) последующего приведения в контакт липосомы с ТЭА-СОС с иринотеканом в условиях, эффективных для проникновения в липосому иринотекана и позволяющих соответствующему количеству ТЭА покидать липосому (тем самым истощая или снижая градиент концентрации ТЭА внутри получаемой липосомы).

Первая стадия может включать образование содержащей ТЭА-сукрозофат липосомы путем гидратации и диспергирования липосомных липидов в растворе сукрозофата ТЭА. Этот процесс можно выполнять, например, растворением липидов, включая ГСФХ и холестерин, в подогретом этаноле и диспергированием растворенного и подогретого липидного раствора в водном растворе ТЭА-сукрозофата при температуре выше температуры фазового перехода (Tm) липосомного липида, например 60°С или выше. Липидная дисперсия может превращаться в липосомы, имеющие средний размер 75-125 нм (например, 80-120 нм или в некоторых вариантах реализации изобретения 90-115 нм), путем экструзии через направленно-протравленные поликарбонатные мембраны с определенным размером пор, например 100 нм. ТЭА-сукрозофат может содержать по меньшей мере 8 молярных эквивалентов ТЭА на каждый молярный эквивалент сукрозофата для получения раствора, который может иметь концентрацию около 0,40-0,50 N и значение pH (например, около 6,5), что выбрано для предотвращения недопустимого разложения липосомного фосфолипида во время стадий диспергирования и экструзии (например, pH выбран с целью минимизации разложения липосомного фосфолипида во время этих стадий). Затем перед инкапсулированием лекарственного средства незахваченный ТЭА-СОС можно удалять из липосомной дисперсии, например, диализом, гель-хроматографией, ионным обменом или ультрафильтрацией. Получаемые липосомы могут содержать сукрозофат ингибитора протеинкиназы ATR. Эти липосомы с ингибитором ATR можно стабилизировать введением внутрь липосом достаточного количества лекарственного средства для снижения количества ТЭА в получаемой липосомной композиции до уровня, приводящего к образованию лизо-ФХ на меньшем, чем заданный максимальный, уровне через 180 суток при 4°С, или меньшем, чем заданный максимальный, уровне степени накопления лизо-ФХ в липосомной композиции во время хранения в холодильнике при температуре около 4°С или чаще отмечаемой как при  $5\pm3^{\circ}$ С, измеренной, например, в мг/мл/месяц или % преврашения ФХ в лизо-ФХ в течение единицы времени, например мол.% лизо-ФХ/месяц. Лалее, как правило, обмениваемый ТЭА из липосом удаляется из них во внешнюю среду в процессе наполнения вместе с любым незахваченным ингибитором ATR любым(и) подходящим(и) процессом(ами) (например, гель-хроматографией, диализом, диафильтрацией, ионным обменом или ультрафильтрацией). Внешнюю среду липосом можно заменять инъекционной изотонической текучей средой (например, изотоническим раствором хлорида натрия), забуференного при требуемом рН.

Противоопухолевую эффективность различных составов липосом, содержащих инкапсулированные в липосомы соединения-ингибиторы протеинкиназы ATR, исследовали на линии клеток рака шейки матки человека (например, линии клеток MS751, C33A и SiHa, как показано в примере 9) и различных линиях клеток рака легкого, включая линию клеток плоскоклеточной карциномы (например, линия клеток NCI-H2170 в примере 10), линию клеток мелкоклеточной карциномы (например, линия клеток DMS-114 в примере 10) и линии клеток человека Calu-6 и COLO-699 (пример 11).

Как проиллюстрировано на фиг. 6-9 и в примере 9, липосомный состав ингибирующего ATR соединения A (пример 7) исследовали на трех линиях клеток рака шейки матки человека на мышиной модели ксенотрансплантата (пример 9A) самостоятельно и в комбинации с липосомным составом MM-398 с иринотеканом (пример 9B). С течением времени больший объем опухоли наблюдали для липосомального состава с соединением A примера 7 по сравнению с контрольным экспериментом для 2 из 3 линий клеток рака шейки матки человека (MS571 и C33A). Тем не менее введение липосомы MM-398 с иринотеканом (пример 9B) в комбинации с липосомным составом с соединением A (пример 7) приводило к большей супрессии объема опухоли во всех трех линиях клеток рака шейки матки, чем либо самостоятельное введение MM-398, либо самостоятельное введение липосомального соединения A.

Как проиллюстрировано на фиг. 10А, 10В и 11А, 11В, липосомный состав ингибирующего ATR соединения 5 формулы (I) и формулы (Ia) (соединение примера 1, приготовленного в виде липосомы, как описано в примере 7) исследовали на двух линиях клеток рака легкого на мышиной модели ксенотрансплантата (пример 10) самостоятельно и в комбинации с липосомным составом MM-398 с иринотеканом (пример 9В). Как проиллюстрировано на фиг. 10А и 10В, введение липосомного состава соединения 5 снижало объем опухоли в каждой исследованной линии клеток по сравнению с контрольным экспериментом в примере 10, а комбинация MM-398 липосомной композиции соединения 5 примера 7 снижала объем опухоли на мышиной модели в большей степени, чем любое соединение, введенное независимо от других. Аналогичным образом, кривые выживаемости Каплана-Мейера, представленные в примере 10 (фиг. 11А и 11В), демонстрируют увеличение выживаемости у мышей с ксенотрансплантатом рака легкого, исследованного при комбинированном введении липосомы MM-398 с иринотеканом примера 9В в сочетании с липосомным составом соединения 5 примера 7, используя две различные линии клеток. Как проиллюстрировано на фиг. 12А и 12В, в примере 10 оценивали переносимость различных липосомных составов соединений-ингибиторов протеинкиназы ATR. Как проиллюстрировано на фиг. 12А, снижение массы тела мышей, исследованное на мышиной модели ксенотрансплантата NCI-H2170, было наименьшим с течением времени для липосомного состава соединения 5 (пример 7) по сравнению с липосомой MM-398 с иринотеканом (пример 9В), контролем или комбинацией липосомного состава соединения 5 в сочетании с MM-398. Как проиллюстрировано на фиг. 12В, снижение массы тела мышей, исследованное на мышиной модели ксенотрансплантата DMS-114, было наименьшим с течением времени для комбинации липосомного состава соединения 5 в сочетании с MM-398 по сравнению с липосомным составом соединения 5 (пример 7) или липосомы MM-398 с иринотеканом (пример 9В), вводимых независимо.

Как проиллюстрировано на фиг. 13А и 13В, введение комбинации липосомы MM-398 с иринотеканом (пример 9В) с липосомным составом ингибирующего протеинкиназу ATR соединения 5 приводило к большему снижению объема опухоли как в линии клеток Calu-6, так и COLO699 на мышиных моделях ксенотрансплантатов по сравнению с контролем введением только липосомы MM-398 с иринотеканом, введением липосомного состава с соединением A (пример 7) или комбинацией липосомы MM-398 с иринотеканом (пример 9В) с липосомным составом соединения A (пример 7).

## Примеры

Некоторые варианты реализации изобретения иллюстрируются в следующих примерах. Эти примеры и способы получения, которым следуют, представлены для того, чтобы специалисты в данной области техники могли четко понять и осуществить на практике эти и другие варианты реализации настоящего изобретения. Их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения, но просто как иллюстративные и репрезентативные.

Пептид ATR можно экспрессировать и выделять с использованием различных способов, известных в литературе (см., например, Unsal-Kagmaz et al., PNAS 99: 10, р. 6673-6678, 14 мая 2002; см. также Kumagai et al., Cell 124, р. 943-955, 10 марта 2006; Unsal-Kacmaz et al., Molecular and Cellular Biology, February 2004, р. 1292-1300; и Hall-Jackson et al., Oncogene 1999, 18, 6707-6713).

Соединение А можно получать способами, раскрытыми (например) в публикации WO 2010/071827 A1 (опубликованной 24 июня 2010 г.), части которой, относящиеся к синтезу и применению соединения II-А-7, включены в данный документ путем ссылки. Ниже приводится структура соединения А



Соединение А

Различные соединения формулы (I) можно получать как описано в данном документе, и они обобщены ниже в таблице 1.

Таблица 1



### 039513



Примеры 1, 2, 3 и 6 получены в одностадийной реакции кросс-сочетания Судзуки с использованием сложного эфира борной кислоты, получаемого in situ, по схеме 1 на фиг. 1. Как проиллюстрировано на фиг. 1, синтез промежуточного соединения 3 - 1-бром-4-(2-бромэтилсульфонил)бензола - может быть проведен как описано ниже.



Промежут. соедин. 2 Промежут. соедин. 3

К раствору промежуточного соединения 2 (35 г, 133 ммоль) в ДХМ (400 мл) добавляли по каплям PBr<sub>3</sub> (40 г, 146 ммоль) при 0°С. Затем смесь перемешивали при комнатной температуре (к.т.) в течение ночи. Для остановки реакции добавляли воду (15 мл). Затем продукт реакции промывали водой (120 мл) и насыщенным солевым раствором (120 мл). Органическую фазу концентрировали до получения 20 г неочищенного продукта 3 в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Как проиллюстрировано на фиг. 1, синтез промежуточного соединения 2 можно выполнять, как описано ниже.



Промежут. соедин. 1 Промежут. соедин. 2

К раствору промежуточного соединения 1 (45 г, 194 ммоль) в ДХМ (500 мл) при к.т. добавляли несколькими порциями m-CPBA (134 г, 776 ммоль). Затем смесь перемешивали при к.т. в течение ночи. Фильтровали реакционную смесь и добавляли ДХМ (500 мл) для промывания твердой фракции. Фильтрат промывали водой NaOH (1M, 300 мл×3) и насыщенным солевым раствором (300 мл). Органический слой концентрировали до сухого состояния с получением 36 г соединения 2 (70%) в виде белого твердого вещества.

Как проиллюстрировано на фиг. 1, синтез промежуточного соединения 1 можно выполнять как описано ниже.



#### Промежут. соедин. 1

К раствору 4-бромтиофенола (45 г, 238 ммоль) в MeCN (600 мл) добавляли К<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 г, 476 ммоль) и NaI (36 г, 238 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 10 мин. Затем по каплям добавляли 2-бромэтанол. После добавления смесь перемешивали при к.т. в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, а фильтрат концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением 45 г соединения 1 (81%) в виде светло-желтого масла.

Фрагмент В можно получать в соответствии со схемой 2 на фиг. 2. Как проиллюстрировано на фиг. 2, синтез фрагмента В можно выполнять, как описано ниже.



К раствору промежуточного соединения 6 (6,0 г, 27,4 ммоль) в ДМСО (30 мл) добавляли CDI (8,9 г, 54,8 ммоль), DIPEA (3,8 г, 30,1 ммоль) и DMAP (0,17 г, 1,37 ммоль). Раствор перемешивали при к.т. в течение 4 ч. Добавляли анилин (2,5 г, 27,4 ммоль) и перемешивали смесь при к.т. в течение ночи. Добавляли воду и образовавшееся твердое вещество собирали фильтрованием. Неочищенный продукт очищали на колонке с силикагелем с получением 2,5 г фрагмента В (31%) в виде желтого твердого вещества.

ЖХ-МС (M+1): 293,2; <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,28 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,78 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,74 (s, 2H), 7,36 (t, J=8,0 Гц, 2H), 7,13 (t, J=7,6 Гц, 1H).

Снова, как проиллюстрировано на фиг. 2, синтез промежуточного соединения 6 можно выполнять, как описано ниже.



Промежут. соедин. 6

К раствору метил 3-амино-6-бромпиразина-2-карбоксилата (10,0 г, 43,1 ммоль) в МеОН (70 мл) добавляли раствор LiOH (9,0 г, 215 ммоль) в воде (70 мл). Смесь перемешивали при 90°С в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т. и подкисляли до рН 4~5 с помощью HCl (2 M). Смесь фильтровали с получением 7,4 г соединения 6 (79%) в виде желтого твердого вещества.

ЖХ-МС (M+1): 218,0; <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 8,39 (s, 1H), 7,59 (br, 2H).

Пример 1. Синтез соединения 5 (3-амино-6-(4-((2-(диметиламино)этил)пиперидин-1ил)этил)сульфонил)фенил)-N-фенилпиперазин-2-карбоксамида).



Точная масса - 536,26; молекулярная масса - 536,70; соединение 5; более основное; 143 мг; выход 8,2%; pK<sub>a</sub> 10,00.

К раствору 2-(1-(2-((4-бромфенил)сульфонил)этил)пиперидин-4-ил)-N,N-диметилэтан-1-амина (фрагмент A1) (261 мг, 0,648 ммоль) в безводном диоксане (3 мл) добавляли ацетат калия (191 мг, 1,944 ммоль) и бис(пинаколато)диборан (246 мг, 0,971 ммоль), реакционный сосуд дегазировали повторяющимися циклами создания вакуума/подачи азота, а затем добавляли Pd (dppf)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(53 мг, 0,0648 ммоль), снова дегазировали и реакционную смесь нагревали до 90°С в течение 2 ч в атмосфере азота. Затем реакцию охлаждали до к.т. и добавляли 3-амино-6-бром-N-фенилпиразин-2карбоксамид (фрагмент В), 2М  $K_2CO_3$  (1 мл), дегазировали и продували азотом. Добавляли Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (75 мг, 0,0648 ммоль). Подогревали реакционную смесь при 100°С в течение 4 ч. Охлаждали реакционную смесь, разбавляли этилацетатом и промывали солевым раствором три раза, а органический слой высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После удаления растворителя на ротационном испарителе получали остаточный неочищенный продукт в виде темного масла, его очищали колоночной хроматографией на силикагеле (система флэш-хроматографии Reveleris) с использованием в качестве элюента 0-15% метанола в дихлорметане. Требуемый продукт получили в виде желтого твердого вещества (149 мг, выход 43%).

MC (M+H)<sup>+</sup>537; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,45 (s, 1H), 9,03 (s, 1H), 8,49 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,95 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,88 (s, br, 2H), 7,81 (d, 2H, 8,8 Гц), 7,40 (t, 2H, 7,2 Гц), 7,18 (t, 1H, 7,2 Гц), 3,53 (t, 2H, 7,2 Гц), 2,64 (d, 2H, 11,6 Гц), 2,55 (t, 2H, 7,2 Гц), 2,05 (m, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,17 (m, 2H), 1,42 (d, 2H, 12,0 Γц), 1,18 (m, 3H), 0,78 (m, 2H).

Значение массы высокого разрешения (масс-спектрометр Thermo ScientificTM Q ExactiveTM с гибридным квадруполем Orbitrap), рассчитанное для  $C_{28}H_{36}N_6O_3S+Протон(1,00728)=537,2642$ ; теоретическое соотношение m/z с однозарядным ионом - 537,2642; установленное - 537,2636.

Пример 2. Синтез соединения 6 (3-амино-6-(4-((2-(4-(диэтиламино)пиперидин-1 ил)этил)сульфонил)фенил)-N-фенилпиразин-2-карбоксамида).



Точная масса - 536,26; молекулярная масса - 536,70; соединение 6; более основное; 53 мг; выход 11,1%; pK<sub>a</sub> 9,81.

Соединение примера 2 получали аналогичным образом с использованием фрагмента A2 (1-(2-((4бромфенил)сульфонил)этил)-N,N-диэтилпиперидин-4-амина), получили желтое твердое вещество (52 мг, выход 24%).

MC (M+H)<sup>+</sup>537; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,45 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,51 (d, 2H, 8,4 Гц), 7,94 (d, 2H, 8,8 Гц), 7,87 (s, br, 2H), 7,79 (d, 2H, 8,8 Гц), 7,42 (t, 2H, 8,4 Гц), 7,18 (t, 1H, 7,2 Гц), 3,54 (t, 2H, 6,4 Гц), 2,65 (d, 2H, 11,2 Гц), 2,56 (t, 2H, 6,4 Гц), 2,20 (q, 4H, 6,8 Гц), 1,71 (t, 2, 10,4 Гц), 1,33 (d, 2H, 12,4 Гц), 0,85 (qd, 2H, 12,4 Гц), 0,74 (t, 6H, 7,2 Гц).

Аналогичным образом получали 1-(2-((4-бромфенил)сульфонил)этил)-N,N-диэтилпиперидин-4амин (фрагмент А2) с использованием соответствующего 4-диэтиламинопиперидина.

Получили бесцветное масло (661 мг, выход 47%), МС (М+H)<sup>+</sup>403, 405.

Пример 3. Синтез соединения 2 (3-амино-6-(4-((2-(диметиламино)этил)сульфонил)фенил)-Nфенилпиперазин-2-карбоксамида).



Точная масса - 453,18; молекулярная масса - 453,56; соединение 2; менее основное; 98 мг; выход 7,7%; pK<sub>a</sub> 7,46.

Соединение примера 3 получали аналогичным образом с использованием фрагмента АЗ 2-((4бромфенил)сульфонил)-N,N-диэтилэтан-1-амин, получили желтое твердое вещество (98 мг, выход 11%).

MC (M+H)<sup>+</sup>454; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,46 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,51 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,98 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,88 (s, br, 2H), 7,81 (d, 2H, 8,8 Гц), 7,41 (t, 2H, 7,2 Γц), 7,17 (t, 1H, 7,2 Γц), 3,48 (dd, 2H, 6,8 Гц), 2,73 (m, 2H), 2,33 (q, 4H, 6,8 Γц), 0, 81 (t, 6H, 6, 8 Γц).

Аналогичным образом получали фрагмент АЗ (2-((4-бромфенил)сульфонил)этил)-N,N-диэтилэтан-1-амин) с использованием соответствующего 4-диэтиламина. Получили бесцветное масло (1,42 г, выход 73%), МС (М+H)<sup>+</sup>320, 322.

Пример 4. Синтез соединения 4(3-амино-6-(4-(((2-(диметиламино)этил)-λ2-азанил)сульфонил)фенил)-N-фенилпиперазин-2-карбоксамида).



Точная масса - 439,16; молекулярная масса - 439,51; соединение 4; pK<sub>a</sub> 8,36.

Соединение 4 можно получать, как показано на схеме 3 на фиг. 3. К смеси фрагмента В (150 мг, 0,51 ммоль), фрагмента F (153 мг, 0,56 ммоль) и Na<sup>2</sup>CO<sup>3</sup> (216 мг, 2,0 ммоль) в толуоле/этаноле/воде (2 мл/2 мл) добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (30 мг). Смесь перемешивали при 75°C в атмосфере аргона в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением 100 мг TM4 (45%) в виде белого твердого вещества.

ЖХ-МС (M+1): 441,4; <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,88 (s, 1H), 8,33 (dd, J=6,8 Гц, 1,6 Гц, 2H), 8,00 (dd, J=6, 8 Гц, 1,6 Гц, 2H), 7,80 (dd, J=8,4 Гц, 1,2 Гц, 2H), 7,41 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,19 (t, J=7,6 Гц, 1H), 3,10 (t, J=6,4 Гц, 2H), 2,73 (t, J=6,4 Гц, 2H), 2,46 (s, 6H).

Снова, как проиллюстрировано на схеме 3 на фиг. 3, синтез фрагмента F можно выполнять как описано ниже.



К раствору промежуточного соединения 7 (10,0 г, 32,6 ммоль) в ТГФ (200 мл) при -78°С в атмосфере аргона добавляли B(i-Pr)<sub>3</sub> (30,6 г, 163 ммоль). Затем по каплям добавляли n-BuLi (2,5 M, 65 мл). Смесь перемешивали при -78°С в течение 2 ч, а затем при к.т. в течение следующих 16 ч. Для остановки реакции добавляли воду. Смесь концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением 5,2 мг фрагмента F (59%) в виде белого твердого вещества.

ЖХ-МС (М+1): 273,4; <sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 7,90-7,45 (m, 4H), 2,91 (s, 2H), 2,69 (t, J=6,4 Гц, 2H), 2,18 (t, J=6, 8 Гц, 2H), 2,03 (s, 6H).

Снова, как проиллюстрировано на схеме 3 на фиг. 3, синтез промежуточного соединения 7 можно выполнять, как описано ниже.



К раствору 4-бромбензол-1-сульфонилхлорида (20 г, 78,3 ммоль) в ДХМ (300 мл) при 0°С добавляли ТЭА (22 мл, 158 ммоль) с последующим добавлением N,N'-диметилэтан-1,2-диамина (8,3 г, 94,0 ммоль). Полученный раствор перемешивали при к.т. в течение 1 ч, а затем разбавляли ДХМ (300 мл). Раствор промывали водой (200 мл) и насыщенным солевым раствором (200 мл). Органический слой концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением 17,0 г соединения 7 (71%) в виде почти белого твердого вещества.

Пример 5. Синтез соединения 3(3-амино-6-(4-((2-(4-метилпиперазин-1-ил)этил)сульфонил)фенил)-N-фенилпиразин-2-карбоксамида).



Точная масса - 480,19; молекулярная масса - 480,59; соединение 3; рК<sub>а</sub> 7,73.

Соединение примера 5 можно получать по схеме 4, изображенной на фиг. 4. Промежуточное соединение 5 в схеме 4 можно получать, как описано ниже.



К раствору промежуточного соединения 4 (1,7 г, 5,0 ммоль) в ТГФ (30 мл) при -78°С в атмосфере аргона добавляли B(i-Pr)<sub>3</sub> (4,7 г, 25 ммоль). Затем по каплям добавляли n-BuLi (2,5 M, 10 мл). Смесь перемешивали при -78°С в течение 2 ч, а затем при к.т. в течение следующих 16 ч. Для остановки реакции добавляли воду. Смесь концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением 300 мг 5 (19%) в виде белого твердого вещества.

Снова, как проиллюстрировано на фиг. 4, промежуточное соединение 4 в схеме 4 можно получать, как описано ниже.



Промежут. соедин. 3

Промежут. соедин. 4

К раствору промежуточного соединения 3 (20 г, 60 ммоль) в MeCN (300 мл) добавляли 1-метилпиперазин (9,0 г, 90 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16,6 г, 120 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали, а фильтрат концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением 15 г соединения 4 (71%) в виде бежевого твердого вещества.

Пример 6. Синтез соединения 1 (3-амино-6-(4-((1-(диметиламино)пропан-2-ил)сульфонил)фенил)-N-фенилпиразин-2-карбоксамида).



Точная масса - 439,17; молекулярная масса - 439,53; соединение 1; менее основное; 427 мг; выход 12,9%; pK<sub>a</sub> 7,04.

Соединение примера 6 получали в соответствии с процедурой получения соединения 1, предоставленной в J. Med. Chem. 2011, 54, 2320 (дополнительные материалы) за исключением применения 1-бром-4-(2-бромэтилсульфонил)бензола. Получали желтое твердое вещество (427 мг, выход 11%).

MC (M+H)<sup>+</sup>440; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ 10,46 (s, 1H), 9,05 (s, 1H), 8,52 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,93 (d, 2H, 6,8 Гц), 7,89 (s, br, 2H), 7,82 (d, 2H, 8,0 Гц), 7,40 (t, 2H, 7,2 Γц), 7,18 (t, 1H, 7,2 Γц), 3,53 (t, 2H, 7,2 Γц), 2,64 (d, 2H, 11,6 Γц), 2,55 (t, 2H, 7,2 Γц), 2,05 (m, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,17 (m, 2H), 1,42 (d, 2H, 12,0 Γц), 1,18

## (m, 3H), 0,78 (m, 2H).

Пример 7. Получение липосом с захваченными в них солями триметиламмония СОС и введение ATRi в липосомы.

Сахарозооктасульфат натрия (эквивалентная масса 144,8) представляет собой натриевую соль производного сахарозы, у которого все гидроксильные группы образовали сложные эфиры с серной кислотой. Шестьдесят грамм натриевой соли сахарозооктасульфата (СОС) растворяли в 150 мл дист. воды, подогревали со встряхиванием (перемешивание на вихревой мешалке) на водяной бане с температурой 50°С. Раствор пропускали через колонку, заполненную гранулами катионообменной смолы на основе сульфированного сополимера полистирола и дивинилбензола (Dowex 50Wx8-100-200 размер гранул, Dow Chemical Co.). Колонку предварительно уравновешивали водным раствором 3-3,6 М HCl для перевода смолы в протонированную форму и промывали деионизированной водой до тех пор, пока промывные воды продемонстрировали проводимость <1 мкСм/см. Качество элюента отслеживали с использованием детектора проводимости. Фракцию СОС собирали в соответствии с пиком проводимости и немедленно титровали беспримесным раствором триэтиламина (ТЭА) до рН 6-6,5. Раствор анализировали на наличие остаточного натрия потенциометрией с использованием натрий-чувствительного электрода, а для определения концентрации СОС использовали рефрактометр. Дист. водой разбавляли раствор, содержавший остаточный натрий в количестве менее 0,25%, до конечной концентрации СОС 1,1 M, а затем стерильно фильтровали с использованием фильтра Steri-Top Millipore с размером пор 0,22 мкм.

Холестерин (Хол) приобретали у компании Avanti Polar Lipids, г. Алабастер, штат Алабама, США, гидрогенизированный соевый фосфохолин (ГСФХ) и метокси-поли(этиленгликоль)-1,2-дистеароил-snглицерин (ПЭГ2000-ДСГ) получали от компании Lipoid GmbH, г. Людвигсхафен, Германия. Хол, ГСФХ и ПЭГ2000-ДСГ вместе растворяли в 100% этаноле (200-ргооf, № по кат. Sigma 459828) в молярном соотношении 3:2:0,15 при 65°С. Раствор ТЭА-СОС (10-кратный объем к добавленному этанолу) смешивали с липидным раствором при 60-65°С и перемешивали при этой температуре до образования гомогенной суспензии молочного цвета из многослойных везикул. Эту суспензию продавливали 3 раза через стопку из 5 поликарбонатных направленно-протравленных фильтров (Corning Nuclepore) с размером пор 100 нм с использованием экструдера, работающего под давлением аргона (Lipex Biomembranes) при 60-65°С, а получаемые однослойные липосомы быстро охлаждали во льду и затем до использования хранили при 4-6°С. Измеряли концентрацию фосфолипидов проведением анализа на фосфаты и фиксировали диаметр частиц на приборе Malvern Nanosizer.

Перед введением лекарственного средства создавали градиент ТЭА-СОС удалением незахваченного ТЭА-СОС с использованием гель-хроматографии (сефароза CL-4B, Pharmacia). Уравновешивали осмолярность липосом с использованием 50% раствора декстрозы. Конечная концентрация декстрозы составляла 15%.

Ингибиторы ATR растворяли в 15% растворах декстрозы в дист. воде путем титрования 1 М HCl и нагревания при 45°C, а затем фильтровали с помощью шприцевых фильтров NALGENE размером 13 мм и порами 0,2 мкм. Концентрацию лекарственного средства в растворе выявляли методом ВЭЖХ. К липосомам добавляли маточный раствор ингибиторов ATR, содержащий 9-10 мг/мл лекарственных средств в соотношении лекарственные средства/липиды, равном 800 мг/ммоль фосфолипидов, а значение pH корректировали до pH 6,5 с помощью 1М буфера ГЭПЭС и 0,1 N NaOH.

Смесь липосом-лекарственных средств инкубировали с периодическим перемешиванием в течение 30 мин при 65°С. Инкубационную смесь быстро охлаждали и инкубировали в течение 10 мин при 0°С, затем давали возможность достичь температуры окружающей среды. Неинкапсулированное лекарственное средство удаляли гель-хроматографией на колонке сефадекс G-25 (Amersham Pharmacia), которую элюировали буфером HBS-6,5 (5 мМ 2-(4-(2-гидроксиэтил)-пиперазин)-этилсульфоновая кислота (ГЭ-ПЭС), 144 мМ NaCl, pH 6,5). Объединяли элюированные в объем пор фракции липосом, стерилизовали фильтрованием через фильтры с порами 0,2 мкм и перед использованием хранили при 4-6°С. Определяли характеристики липосом по концентрации липидов, концентрации лекарственного средства и размеру частиц (табл. 2). Все ингибиторы АТR продемонстрировали хорошую эффективность по нагрузке за исключением соединения 1, которое при соотношении лекарственное средство к липиду более 400 г/моль образовывало агрегаты и осаждалось.

Определение характеристик липосомы, нагруженной ингибиторами ATR					
	Соотнош. лек.	Соотнош.	Эффективн	Размер	
Ингибитор ATR	ср-во/липид	лек. ср-	ость	липосом,	
	перед	во/липид	введения	(среднее ± СО)	
	введением	после	(%)	HM	
		введения			
Соединение б	743 ± 89	$550 \pm 64$	74 ± 0,3	119 ± 28	
Соединение 2	$642 \pm 10$	639 ± 22	100 ± 5	130 ± 34	
Соединение 5	732 ± 58	$619 \pm 110$	84 ± 8	120 ± 29	
Соединение З	646 ± 28	628 ± 6	97 ± 5	120 ± 27	
Соединение А	736 ± 57	716 ± 41	97 ± 2	121 ± 26	
	600-900	Не нагружается. Образовались агрегаты			
Соединение 1	000-000	и осаждилось		СЪ	
	379	369	98	$122 \pm 24$	

	Таблица 2
реление узрактеристик пипосомы	нагруженной ингибиторами ATP

Пример 8. Общее описание ФК-исследования липосомального ATRi.

На фиг. 5 изображен график, демонстрирующий фармакокинетические параметры в крови липосомальных ингибиторов ATR. Липосомальные составы ингибиторов ATR получали, как описано в примере 7. Трем самкам мышей CD-1 (Charles River) возрастом 7-9 недель (масса тела около 25 г) вводили липосомы внутривенно в дозе 20 мг лекарственного средства/кг. Образцы крови собирали в пробирки с литиемгепарином путем отбора крови из подкожной вены бедра в моменты времени 0,08, 1,5, 4, 8 и 24 ч. Плазму отделяли от клеточной фракции путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 5 мин. Лекарственные средства экстрагировали путем инкубации образцов плазмы с помощью 200 мкл подкисленного 1% кислотой метанола (1% Ac/MeOH) в течение по меньшей мере 2 ч при -80°С. Белки плазмы осаждали путем центрифугирования при 15000 об/мин в течение 20 мин. Затем 75 мкл супернатанта переносили во флаконы для ВЭЖХ (Thermo Scientific, № С4011-LV1 по кат.) и дополнительно добавляли 75 мкл 1% Ас/МеОН. Содержание лекарственного средства анализировали методом ВЭЖХ, для каждого образца измерения проводили дважды. Данные выражали в виде % инъецированной дозы, отмечаемой на графике в зависимости от времени, прошедшего после инъекции. Как показано на фиг. 5, липосомальные составы соединения 1, соединения 3 и соединения 2 оказались неустойчивым в кровотоке, причем соединение 1 и соединение 3 не выявлялись в анализе ВЭЖХ в момент времени 24 ч, а липосомальное соединение 2 не выявлялось уже в момент времени 8 ч. Два липосомальных состава соединения 6 и соединения 5 обладали хорошей длительностью существования в кровотоке с наличием более 16% от начальной инъецированной дозы через 24 ч. В табл. 2 ниже обобщены ФК-кривые в крови. Липосомальные соединение 6 и соединение 5 демонстрируют наиболее высокие периоды полувыведения из плазмы по сравнению с другими липосомальными примерами реализации.

Фармакокі	инетически	е параметры л	ипосомал	ьных инги(	биторов А	Гаолица 5 TR
Лекарственное	Cmax	AUC	Vd	Cl	т1/2	% ID
средство	(мг/мл)	(мг/мл*ч)	(мл)	(мл/ч)	(댁)	после 24 ч
Лс-соединение З	0,271	1,659	2,020	0,330	4,24	0,0
Лс-соединение 6	0,303	3,021	1,655	0,166	6,91	16,4
Лс-соединение 2	0,080	0,160	5,806	2,890	1,39	0,0
Лс-соединение 5	0,227	2,504	2,012	0,182	7,65	17,2
Лс-соединение А	0,237	1,902	0,712	0,089	5,56	9,0
Лс-соединение 1	0,053	0,043	6,358	7,841	0,56	0,0

Пример 9А. Противоопухолевая эффективность и переносимость in vivo лс-соединения А, полученного с использованием ТЭА-СОС, в отношении ксенотрансплантатов рака шейки матки у мышей.

На фиг. 6 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомаль-

ного соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата MS571, как описано в примере 9А.

На фиг. 7 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомального соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата СЗЗА, как описано в примере 9А.

На фиг. 8 изображен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность липосомального соединения А в комбинациях с ММ-398 на модели цервикального ксенотрансплантата СЗЗА, в соответствии с примером 9А.

На фиг. 9 изображен график, демонстрирующий переносимость липосомального соединения А в комбинации с ММ-398 на цервикальной модели MS751, в соответствии с примером 9А.

На модели линий клеток MS751, C33A и SiHa рака шейки матки человека изучали противоопухолевую эффективность липосом, нагруженных ингибирующим ATR соединением A (лс-соединение A) в комбинациях с MM-398 (липосомальный иринотекан). Клетки получали из Американской коллекции типовых культур (г. Роквилл, штат Мэриленд, США) и размножали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата при  $37^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> согласно рекомендациям поставщика. Бестимусных гомозиготных самцов мышей nu/nu NCR (возраст 4-5 недель, масса около 16 г) получали из компании Charles River. Мышам в правый бок подкожно инокулировали 0,1 мл суспензии, содержащей 5×106 клеток, суспендированных в ФСБ с добавкой 30% матригеля. Когда опухоли достигали размера от 150 до 350 мм<sup>3</sup> животных определяли в группы лечения в соответствии со следующей методикой. Животных распределяли в соответствии с размером опухоли и разделяли на шесть категорий снижения размера опухоли. Формировали четыре группы лечения по десять животных/группу путем случайного отбора по одному животному из каждой категории размера таким образом, чтобы в каждой группе лечения были одинаковым образом представлены все размеры опухолей.

Через интервалы по 7 суток животные получали четыре инъекции в хвостовую вену следующих препаратов:

1) контроль (ГЭПЭС-забуференный солевой раствор с рН 6,5);

2) ММ-398 в дозе 2 или 5 мг/кг на инъекцию;

3) липосомальное соединение А по 20 или 60 мг/кг на инъекцию;

4) ММ-398 с последующими инъекциями липосомального соединения А с интервалом 24 ч.

Липосомы для инъекций получали, как описано в примере 7. Дважды в неделю отслеживали массу животных и размер опухоли. Прогрессирование опухолей отслеживали методом пальпации и измерениями опухолей штангенциркулем вдоль наибольшей (длина) и наименьшей (ширина) оси два раза в неделю. По измерениям штангенциркулем дважды в неделю определяли размеры опухолей с использованием формулы (Geran, R.I. et al., 1972 Cancer Chemother. Rep. 3:1-88)

Объем опухоли=[(длина) х (ширина)<sup>2</sup>]/2

Для оценки связанной с лечением токсичности также два раза в неделю взвешивали животных. За животными вели наблюдение в течение 60 суток после инокуляции опухоли. Когда опухоли в группе достигали 10% от массы тела мыши, животных в группе подвергали эвтаназии. На графике вместе отмечали средние значения объемов опухолей среди группы и сравнивали их с течением времени. Как изображено на фиг. 6, 7 и 8 комбинация липосомального ингибирующего АТК соединения А с MM-398 оказывает значимо более сильное противоопухолевое воздействие по сравнению с только MM-398 и только липосомальным соединением А во всех трех моделях ксенотрансплантата. Связанную с лечением токсичность оценивали по динамике изменения массы тела животных (фиг. 9). Ни в одной из групп не выявлено какой-либо значимой токсичности. Масса животных во всех получавших лечение группах была сравнимой с контрольной группой и сопоставимо возрастала. Таким образом, липосомный состав ингибирующего АТК соединения А продемонстрировал увеличенную противоопухолевую активность на исследованных моделях опухолей без существенного увеличения токсичности.

Пример 9В. Производство липосом ММ-398 с иринотеканом.

Использованный в примере 9А и в других местах данного документа состав ММ-398 представляет собой липосому с иринотеканом, которую получали в многостадийном процессе. Сначала липиды растворяли в подогретом этаноле. Липиды могут включать ДСФХ, холестерин и МПЭГ-2000-ДСФЭ, объединенные в молярном соотношении 3:2:0,015. Предпочтительно в липосомах можно инкапсулировать иринотекан сахарозооктасульфат (СОС), инкапсулированный в везикулы, состоящие из ДСФХ, холестерина и МПЭГ-2000-ДСФЭ, объединенных в молярном соотношении 3:2:0,015. Получаемый раствор этанола-липидов диспергируют в водной среде, содержащей замещенный амин и полианион в условиях, эффективных для образования по существу однослойной липосомы с требуемым размером (например, 80-120 нм), содержащей замещенный амин (в форме аммония) и полианион, инкапсулированные внутри везикулы, образованной из растворенных липидов. Диспергирование можно выполнять, например, путем смешивания этанольного липидного раствора с водным раствором, содержащим замещенный амин и полианион при температуре выше температуры фазового перехода липидов, например 60-70°С, и экс-

трудированием получаемой гидратированной липидной суспензии (многослойные липосомы) под давлением через один или более направленно-протравленных, например, поликарбонатных, мембранных фильтров с определенным размером пор, например 50, 80, 100 или 200 нм. Замещенный амин может быть триэтиламином (ТЭА), а полианион может быть сахарозооктасульфатом (СОС), объединенными в стехиометрическом соотношении (например, ТЭА8-СОС) в концентрации около 0,4-0,5 N. Затем перед приведением в контакт липосом с иринотеканом весь или практически весь незахваченный ТЭА или СОС удаляют (например, гель-фильтрацией, диализом или ультрафильтрацией) в условиях, эффективных для обеспечения проникновения иринотекана в липосомы с обменом на ТЭА, покидающего липосомы. Условия могут включать одно или более условий, выбранных из группы, состоящей из добавления осмотического агента (например, 5% декстрозы) ко внешней среде липосом для уравновешивания осмоляльности захваченного раствора ТЭА-СОС и/или предотвращения осмотического разрушения липосом во время их наполнения, корректирования и/или выбора рН (например до 6,5) для снижения разложения лекарственных средств и/или липидов во время стадии введения и увеличения температуры выше температуры фазового перехода липосомных липидов (например, до 60-70°C) для ускорения трансмембранного обмена ТЭА и иринотекана. Введение иринотекана путем обмена с ТЭА внутри липосом предпочтительно продолжается до тех пор пока весь или практически весь ТЭА удаляется из липосомы, тем самым истощается его градиент концентрации внутри липосом. Предпочтительно процесс введения иринотекана в липосомы продолжается до тех пор, пока соотношение грамм-эквивалента иринотекана к сахарозооктасульфату составляет по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 0,95, 0,98, 0,99 или 1,0 (или диапазоны около 0,9-1,0, 0,95-1,0, 0,98-1,0 или 0,99-1,0). Предпочтительно процесс введения иринотекана в липосомы продолжается до тех пор, пока ТЭА составляет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или больше ТЭА, удаляемого из внутреннего пространства липосом. Иринотекан может образовывать сукрозофат иринотекана внутри липосомы, например иринотекан и сахарозооктасульфат в молярном соотношении около 8:1. Далее любой оставшийся экстралипосомальный иринотекан и ТЭА удаляется с получением липосомы с иринотеканом с использованием, например, методов гель(эксклюзионной)-хроматографии, диализа, ионообмена или ультрафильтрации. Внешняя среда липосом замещается инъекционной, фармакологически приемлемой текучей средой, например забуференным изотоническим раствором. Наконец, липосомную композицию стерилизуют, например, путем 0,2-микронной фильтрации, разливают в дозированные флаконы, маркируют и хранят до применения, например, в холодильнике при 2-8°С. Липосомную внешнюю среду можно заменять фармакологически приемлемой текучей средой одновременно с удалением остающихся экстралипосомальных иринотекана и ТЭА. Экстралипосомальное рН композиции можно корректировать или выбирать иным образом для обеспечения требуемого свойства стабильности хранения (например, для снижения образования лизо-ФХ внутри липосомы во время хранения при 4°C в течение 180 суток), например, путем получения композиции при pH около 6,5-8,0 или любого подходящего значения pH, находящегося в этом диапазоне (включая, например, 7,0-8,0, и 7,25).

Взвешивали ДСФХ, холестерин (Хол) и ПЭГ-ДСФЭ в количествах, которые соответствуют молярному соотношению 3:2:0,015 соответственно (например, 1264 мг/412,5 мг/22,44 мг). Липиды растворяли в хлороформе/метаноле (4/1 об./об.), тщательно перемешивали и разделяли на 4 аликвоты (А-D). Каждый образец испаряли до сухого состояния с использованием ротационного испарителя при 60°С. Остаточный хлороформ удаляли из липидов под воздействием вакуума (180 мкТорр) при к.т. в течение 12 ч. Высушенные липиды растворяли в этаноле при 60°С и добавляли предварительно подогретый ТЭА<sub>8</sub>-СОС в соответствующей концентрации таким образом, чтобы конечное содержание спирта составляло 10% (об./об.). Концентрация липидов составляла 75 мМ.

Липидную дисперсию экструдировали при около 65°С через 2 совмещенные поликарбонатные мембраны на 0,1 мкм (Nucleopore) 10 раз с использованием термобаррельного экструдера Lipex (Northern Lipids, Канада) для получения липосом с типичным средним диаметром 95-115 нм (определенным методом квазиупругого светорассеяния). При необходимости значение pH экструдированных липосом корректировали 1 N NaOH до pH 6,5. Липосомы очищали комбинацией ионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Сначала смолу DOWEX IRA 910 обрабатывали 1 N NaOH с последующими 3 промывками деионизированной водой, а затем последующими 3 промывками 3 N HCI и далее многократными промывками водой. Липосомы пропускали через подготовленную смолу и измеряли проводимость элюируемых фракций, применяя измеритель проводимости с проточной ячейкой (Pharmacia, г. Упсалла, Швеция). Фракции признавали приемлемыми для дополнительной очистки, если проводимость была менее 15 мкСм/см. Затем элюат липосом наносили на колонку сефадекс G-75 (Pharmacia), уравновешенную деионизированной водой и проводили измерение проводимости собранной фракции липосом (обычно значение составляло менее 1 мкСм/см). Трансмембранную изотоничность обеспечивали добавлением 40% раствора декстрозы до конечной концентрации 5% (об./об.) и добавляли буфер (ГЭПЭС) из маточного раствора (0,5 M, pH 6,5) до конечной концентрации 10 мМ.

Маточный раствор иринотекана готовили растворением порошка тригидрата иринотекана-HCl в деионизированной воде до концентрации 15 мг/мл безводного иринотекана-HCl, принимая в расчет содержание воды и уровни примесей, полученные из сертификата анализа каждой серии. Введение лекарственного средства инициировали добавлением иринотекана при содержании липосомного фосфолипида 500 г/моль и нагреванием до 60±0,1°C в течение 30 мин на горячей водяной бане. После удаления из водяной бани растворы быстро охлаждали погружением в ледяную воду. Экстралипосомальное лекарственное средство удаляли эксклюзионной хроматографией с использованием колонок с сефадексом G75, уравновешенных и элюированных забуференным ГЭПЭС солевым раствором (10 мМ ГЭПЭС, 145 мМ NaCl, рН 6,5). Образцы анализировали на содержание иринотекана методом ВЭЖХ, а фосфата методом Бартлетта (см. определение фосфата).

Одним предпочтительным примером стабильной в хранении липосомы с иринотеканом, описанным в данном документе, является продукт, который будет выпускаться под маркой ОНИВАЙД® (инъекционный препарат липосом с иринотеканом). ОНИВАЙД представляет собой ингибитор топоизомеразы, приготовленный с иринотеканом гидрохлоридом тригидратом в виде липосомальной дисперсии для внутривенного применения. ОНИВАЙД назначали для лечения метастатической аденокарциномы поджелудочной железы после прогрессирования заболевания с последующей терапией на основе гемцитабина.

ОНИВАЙД представляет собой стабилизированную для хранения липосому, имеющую рН около 7,25. Продукт ОНИВАЙД содержит сукрозофат иринотекана, инкапсулированный в липосоме, получаемый из исходного вещества иринотекана гидрохлорида тригидрата. Химическое название иринотекана (S) 4,11-диэтил-3,4,12,14-тетрагидро-4-гидрокси-3,14-диоксо-1Н-пирано[3',4':6,7]-индолизино[1,2b]хинолин-9-ил-[1,4'-бипиперидина]-l'-карбоксилат. Дозировку препарата ОНИВАЙД можно рассчитывать на основании эквивалентного количества исходного вещества иринотекана гидрохлорида тригидрата, используемого для получения липосом с иринотеканом, или на основании количества иринотекана в липосоме. На грамм иринотекана гидрохлорида тригидрата приходится около 866 мг иринотекана. Например, доза ОНИВАЙД, составляющая 80 мг на основании количества исходного вещества иринотекана гидрохлорида тригидрата в действительности содержит около 0,866×(80 мг) иринотекана в конечном продукте (т.е. доза 80 мг/м<sup>2</sup> ОНИВАЙДа на основании массы исходного вещества иринотекана гидрохлорида эквивалентна около 70 мг/м<sup>2</sup> иринотекана в конечном продукте). Препарат ОНИВАЙД является стерильной опалесцирующей изотонической липосомальной дисперсией от белого до слегка желтого цвета. Каждый рассчитанный на одну дозу флакон объемом 10 мл содержит 43 мг свободного основания иринотекана в концентрации 4,3 мг/мл. Липосома представляет собой однослойную везикулу с одним липидным бислоем диаметром приблизительно 110 нм, в которой инкапсулирована водная фаза, содержащая иринотекан в желатинизированном или осажденном состоянии в виде сахарозооктасульфатной соли. Везикула состоит из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ДСФХ), 6,81 мг/мл, холестерина, 2,22 мг/мл и метокси-терминированного полиэтиленгликоля (ММ 2000)-дистеароилфосфатидилэтаноламина (МПЭГ-2000-ДСФЭ), 0.12 мг/мл. Каждый мл также содержит 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1ил]этансульфоновую кислоту (ГЭПЭС) в качестве буфера, 4,05 мг/мл, и хлорид натрия в качестве реагента для обеспечения изотоничности, 8,42 мг/мл. Каждый флакон ОНИВАЙД содержит 43 мг/10 мл свободного основания иринотекана в виде опалесцирующей липосомальной дисперсии от белого до слегка желтого цвета во флаконе для одной дозы.

В одном примере данного изобретения стандартная лекарственная форма ОНИВАЙДа представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую некоторое количество иринотекана, инкапсулированное в липосому, которая предоставляет общее количество около 70 мг/м<sup>2</sup> иринотекана, обеспечивая количество иринотекана, эквивалентное 80 мг/м<sup>2</sup> иринотекана гидрохлорида тригидрата и менее около 20% лизо-ФХ. Стандартная лекарственная форма может быть внутривенным составом, имеющим общий объем около 500 мл. Препарат ОНИВАЙД готовят для введения путем разбавления изотионической липосомальной дисперсии из флакона следующим образом: извлекают рассчитанный объем препарата ОНИВАЙД разбавляют в 500 мл 5% растворе декстрозы для инъекций (Фарм. США) или 0,9% растворе хлорида натрия для инъекций (Фарм. США) и смешивают разбавленный раствор от света и вводят его в течение 4 ч после приготовления при хранении при к.т. или в течение 24 ч после приготовления при хранении в холодильнике [от 2 до 8°C (от 36 до 46°F)].

Препарат ОНИВАЙД (липосомы с иринотеканом для инъекций) назначают в комбинации с 5-фторурацилом и лейковорином для лечения пациентов с метастатической аденокарциномой поджелудочной железы после прогрессирования заболевания с последующей терапией на основе гемцитабина. ОНИВАЙД вводят перед лейковорином и фторурацилом. Рекомендованная доза препарата ОНИВАЙД составляет 70 мг/м<sup>2</sup> иринотекана, которую вводят путем внутривенного вливания в течение 90 мин каждые 2 недели. Рекомендованная начальная доза препарата ОНИВАЙД для пациентов, которые, как известно, гомозиготны по аллелю UGT1A1\*28, составляет 50 мг/м<sup>2</sup> иринотекана, которую вводят путем внутривенного вливания в течение 90 мин. В последующих циклах терапии дозу препарата ОНИВАЙД можно увеличивать по мере переносимости до 70 мг/м<sup>2</sup>. Для пациентов с уровнем билирубина в сыворотке выше верхнего предела нормы не рекомендуется введение доз препарата ОНИВАЙД. Препарата ОНИВАЙД вводят внутривенным вливанием в виде разбавленного раствора в течение 90 мин. Подходящие схемы лечения включают дозу препарата ОНИВАЙД 70 мг/м<sup>2</sup> с (l+d рацемической формой) лейковорина 400 мг/м<sup>2</sup> (или 200 мг/м<sup>2</sup> активной формы 1 лейковорина) и фторурацила 2400 мг/м<sup>2</sup> в течение 46 ч каждые 2 недели (ОНИВАЙД/5-ФУ/ЛВ; n=117), ОНИВАЙД 100 мг/м<sup>2</sup> каждые 3 недели (n=147) или лейковорин 200 мг/м<sup>2</sup> и фторурацил 2000 мг/м<sup>2</sup> в течение 24 ч раз в неделю в течение 4 недель с последующим перерывом на 2 недели (5-ФУ/ЛВ; n=134).

Пример 10. Противоопухолевая эффективность и переносимость in vivo лс-соединения 5, полученного с использованием ТЭА-СОС, в отношении ксенотрансплантатов рака легкого у мышей.

На каждой из фиг. 10А и 10В изображен график, демонстрирующий эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиных моделях ксенотрансплантатов NCI-H2170 (фиг. 10А) или DMS-114 (фиг. 10В), обсуждаемых в примере 10.

На каждой из фиг. 11А и 11В изображен график, демонстрирующий кривые выживаемости Каплана-Мейера, представляющие эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиной модели ксенотрансплантата NCI-H2170 (фиг. 11А) и DMS-114 (фиг. 11В), как обсуждается в примере 10.

На каждой из фиг. 12А и 12В изображен график, демонстрирующий переносимость липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиной модели ксенотрансплантата NCI-H2170 (фиг. 12А) или DMS-114 (фиг. 12В).

На модели линий клеток рака легкого человека NCI-H2170 (плоскоклеточная карцинома легкого) и DMS-114 (мелкоклеточная карцинома легкого) изучали противоопухолевую эффективность липосом, нагруженных ингибирующим ATR соединением 5 в комбинациях с MM-398 (липосомальный иринотекан).

Клетки получали из Американской коллекции типовых культур (г. Роквилл, штат Мэриленд, США) и размножали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата при  $37^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> согласно рекомендациям поставщика. Бестимусных гомозиготных самцов мышей nu/nu NCR (возраст 4-5 недель, масса около 16 г) получали из компании Charles River. Мышам в правый бок подкожно инокулировали 0,1 мл суспензии, содержащей  $5 \times 10^6$  клеток, суспендированных в ФСБ с добавкой 30% матригеля. Когда опухоли достигали размера от 150 до 350 мм<sup>3</sup>, животных определяли в группы лечения в соответствии со следующей методикой. Животных распределяли в соответствии с размером опухоли и разделяли на шесть категорий снижения размера опухоли. Формировали четыре группы лечения по десять животных/группу путем случайного отбора по одному животному из каждой категории размера таким образом, чтобы в каждой группе лечения были одинаковым образом представлены все размеры опухолей. Через интервалы по 7 суток животные получали четыре инъекции в хвостовую вену следующих препаратов:

1) контроль (ГЭПЭС-забуференный солевой раствор с рН 6,5);

2) ММ-398 в дозе 5 мг/кг на инъекцию;

3) липосомальное соединение 5 по 80 мг/кг на инъекцию;

4) ММ-398 с последующими инъекциями липосомального соединения 5 с интервалом 24 ч.

Липосомы для инъекций получали, как описано в примере 7. ММ-398 описано в примере 9В. Дважды в неделю отслеживали массу животных и размер опухоли. Прогрессирование опухолей отслеживали методом пальпации и измерениями опухолей штангенциркулем вдоль наибольшей (длина) и наименьшей (ширина) оси два раза в неделю. По измерениям штангенциркулем дважды в неделю определяли размеры опухолей с использованием формулы

Объем опухоли=[(длина) х (ширина)<sup>2</sup>]/2

Для оценки, связанной с лечением токсичности, также два раза в неделю взвешивали животных. Когда опухоли в группе достигали 10% от массы тела мыши, животных в группе подвергали эвтаназии. На графике вместе отмечали средние значения объемов опухолей среди группы и сравнивали их с течением времени.

Как продемонстрировано на фиг. 10А, 10В и 11А, 11В, липосомальное ингибирующее ATR соединение 5 значимо улучшило противоопухолевую эффективность MM-398 на обеих моделях ксенотрансплантатов легкого. Комбинированное лечение липосомальным ингибитором ATR и MM-398 не влияло на массу тела животных (фиг. 12А и 12В).

Пример 11. Сравнение противоопухолевой эффективности in vivo липосомальных ингибиторов лс-соединения 5 и лс-соединения А в комбинации с ММ-398 против ксенотрансплантатов рака легкого у мышей.

На фиг. 13А и 13В изображены графики, демонстрирующие эффективность липосомального соединения 5 в комбинации с ММ-398 на мышиных моделях ксенотрансплантатов Calu-6 (фиг. 13А) или CO-LO-699 (фиг. 13В). Например, данные на фиг. 13А и 13В демонстрируют, что в то время как липосомальное ингибирующее ATR соединение 5 значимо улучшило противоопухолевую эффективность MM-398 в обеих моделях, соединение А, приготовленное в виде липосом, было активным только на модели ксенотрансплантата COLO-699.

На модели ксенотрансплантатов линий клеток Calu-6 и COLO-699 рака легкого человека сравнивали противоопухолевую эффективность липосом, нагруженных ингибирующим ATR соединением 5, в комбинациях с ММ-398 (липосомальный иринотекан).

Клетки получали из Американской коллекции типовых культур (г. Роквилл, штат Мэриленд, США) и размножали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата при  $37^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> согласно рекомендациям поставщика. Бестимусных гомозиготных самцов мышей nu/nu NCR (возраст 4-5 недель, масса около 16 г) получали из компании Charles River. Мышам в правый бок подкожно инокулировали 0,1 мл суспензии, содержащей 5×106 клеток, суспендированных в ФСБ с добавкой 30% матригеля. Когда опухоли достигали размера от 150 до 350 мм<sup>3</sup>, животных определяли в группы лечения в соответствии со следующей методикой. Животных распределяли в соответствии с размером опухоли и разделяли на шесть категорий снижения размера опухоли. Формировали четыре группы лечения по десять животных/группу путем случайного отбора по одному животному из каждой категории размера таким образом, чтобы в каждой группе лечения были одинаковым образом представлены все размеры опухолей. Через интервалы по 7 суток животные получали четыре инъекции в хвостовую вену следующих препаратов:

- 1) контроль (ГЭПЭС-забуференный солевой раствор с рН 6,5);
- 2) ММ-398 в дозе 10 или 20 мг/кг на инъекцию;
- 3) липосомальное соединение 5 по 80 мг/кг на инъекцию;
- 4) липосомальное соединение А по 80 мг/кг на инъекцию;
- 5) ММ-398 с последующими инъекциями липосомального соединения 5 с интервалом 24 ч;
- 6) MM-398 с последующими инъекциями липосомального соединения А с интервалом 24 ч.

Липосомы для инъекций получали, как описано в примере 7. Дважды в неделю отслеживали массу животных и размер опухоли. Прогрессирование опухолей отслеживали методом пальпации и измерениями опухолей штангенциркулем вдоль наибольшей (длина) и наименьшей (ширина) оси два раза в неделю. По измерениям штангенциркулем дважды в неделю определяли размеры опухолей с использованием формулы

# Объем опухоли=[(длина)×(ширина)<sup>2</sup>]/2

Для оценки связанной с лечением токсичности также два раза в неделю взвешивали животных. Когда опухоли в группе достигали 10% от массы тела мыши, животных в группе подвергали эвтаназии. На графике вместе отмечали средние значения объемов опухолей среди группы и сравнивали их с течением времени.

Пример 12. Скрининговое исследование комбинации со свободным лекарственным средством.

На фиг. 14А изображен график, демонстрирующий уничтожение клеток in vitro монотерапией соединением 6 и соединением 5 на наборе линий клеток рака легкого. Соединение 5 является более эффективным со значением IC50, меньшим в  $\sim$ 3 (=100,5) раза, чем для соединения 6. На фиг. 14В изображен график, демонстрирующий влияние соединения 5 по сравнению с соединением 6 в комбинации с тремя химиотерапевтическими агентами (карбоплатин, гемцитабин, соединение В). На фигуре сравниваются IC50 в виде log (мкМ) комбинации химиотерапевтических агентов с 1 мкг/мл соединения 6 или соединения 5. Добавление соединения 5 к химиотерапевтическим агентов с 1 мкг/мл соединеным (меньшее IC50), чем соединения 6 для всех исследованных цитотоксических агентов и во всех линиях клеток за исключением одной.

На фиг. 15 изображен график, демонстрирующий комбинацию (примера 2 + соединения В) со сдвигом IC50 на линии клеток Sum190PT (TNBC).

На фиг. 16А и 16В представлены графики, демонстрирующие сравнение сдвигов IC50 соединения примера 2 с соединением В по сравнению с комбинацией соединения А с соединением В на линии клеток MDA-MB-453 (TNBC).

# Условия культивирования/обработки.

Исследование эффективности in vitro выполняли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO (Promega) на 384-луночных планшетах с белым прозрачным дном, № 3707 по кат. Corning. Клетки высевали на планшеты (1000 клеток/лунку) в 384-луночном формате и обеспечивали инкубирование при 37°С в течение 24 ч. Добавляли лекарственные средства для монотерапии в момент времени 24 ч, а затем обеспечивали инкубирование при 37°С в течение 24 ч. В момент времени 48 ч из среды удаляли лекарственные средства, промывали ФСБ и добавляли свежую среду. Затем обеспечивали инкубирование клеток при 37°С в течение 72 ч. Для исследования комбинаций клетки подвергали воздействию карбоплатина или соединения В или гемцитабина в течение 24 ч, затем удаляли химиотерапевтический агент и клетки подвергали воздействию вторичного соединения (ингибитор ATR) в течение 24 ч. Клетки культивировали в свежей среде в течение дополнительных 48 ч.



В момент времени 120 ч удаляли среду и добавляли реагент CELLTITER-GLO (СТG) (в соотношении 1:1 с ФСБ). Планшеты считывали с использованием люминометра (устройство для считывания Envision Multilabel).

Анализ данных.

Данные анализировали с использованием алгоритма, разработанного с помощью Matlab (Mathworks, г. Натик, штат Массачусетс, США) в компании авторов изобретения. В целом средние значения люминесценции СТG рассчитывали для 4 параллельных лунок. Выявление выпадающих значений выполняли путем расчета коэффициента вариации (КВ>20%) и при вычислении среднего значения их удаляли. Значения СТG нормализировали на основании контрольных необработанных лунок. Концентрацию лекарственного средства в микромолярных (мкМ) единицах перед аппроксимацией по 4-параметрической логистической кривой трансформировали в log.

$$y = b + \frac{(u - b)}{(1 + 10^{(IC50 - C) * HaKJOH})}$$

где С - концентрация лекарственного средства;

у - нормализованное значение СТС;

а - верхняя асимптота (представляющая максимальную гибель клеток);

b - нижняя асимптота (ограниченная 0,8-1,2);

IC50, наклон - коэффициент наклона логистической кривой.

Для подтверждения того что диапазон концентраций является оптимальным, выполняли контроль качества данных в соответствии со следующими правилами: 1) если наименьшая концентрация уничтожает более 70% клеток, то она считается слишком действенной; 2) если наибольшая концентрация уничтожает менее 30% клеток, то диапазон концентраций считается низким или линия клеток слишком устойчивая. В дополнение к этому степень соответствия аппроксимации оценивали с использованием  $R^2$  и  $R^2 < 0.9$  отмечали как неточную аппроксимацию.

Статистический анализ выполняли с использованием JMP (SAS Institute Inc., штат Северная Каролина) и значение p<0,05 считали статистически значимым.

Пример 13. Определение активности ATR.

Для поставляемого набора соединений проводили определение EC50 по отношению к киназе ATR/ATRIP(h) с использованием линейной концентрации фермента в анализе Eurofins ATR/ATRIP HTRF с использованием в качестве субстрата меченого GST полноразмерного p53.

Активность ATR/ATRIP(h) при концентрации ATP в пределах 15 мкМ Km определяли на 9 концентрациях соединения с полулогарифмическими разведениями, начиная с 10 мкМ. ATR/ATRIPфосфорилирование p53 по Ser15 измеряли посредством образования комплекса переноса энергии, состоящего из меченого европием антитела против фосфо-Ser15 p53 и антитела против GST-d2. Все точки данных получали в двух повторах с контролями с ДМСО и холостыми опытами с ЭДТК.

АТК/АТКІР(h) предварительно разбавляли в 25 мМ ГЭПЭС pH 8,0, 0,01% Brij-35, 1% глицерин, 5 мМ ДТТ, 1 мг/мл БСА и анализировали в 25 мМ ГЭПЭС pH 8,0, 0,01% Brij-35, 1% глицерин, 10 мМ MnCl<sub>2</sub> с использованием в качестве субстрата 30 нМ GST, сМус p53-(hu, FL). Реакцию инициировали добавлением АТФ до конечной концентрации 10 мкМ.

Значения отдельных повторных экспериментов выражали в пересчете на % активности положительного контроля с ДМСО. Среднее значение активности (% контроля) каждой ингибирующей концентрации отмечали на графике по сравнению с ингибирующей концентрацией, а значения EC50 определяли с использованием программы GRAPHPAD PRISM.

Данные, выраженные как % активности контроля, отмечали на графике по сравнению с ингибирующей концентрацией и аппроксимировали по четырехпараметрической логистической кривой с использованием GRAPHPAD PRISM. Графики для каждого соединения показаны вместе с данными в сопровождающем отчете в программе Excel. Сводные данные значений активности соединений приведены ниже.

## Таблица 4

Номер	Kranaba	АТФ,	EC50*,	Bonyuoo	HIMILOO	Чампон	<b>m</b> 2
соединения	Киназа	мкМ	нМ	верхнее	пижнее	HARJION	12
Соединение б	ATR ATRIP(h)	10	470,8	101	-2	-0 <b>,</b> 768	0,998
Соединение 2	ATR ATRIP(h)	10	139,8	94	1	-0,911	0,998
Соединение 5	ATR ATRIP(h)	10	233,9	95	1	-0,819	0,996
Соединение 1	ATR ATRIP(h)	10	49,6	95	-1	-0,772	0,994
Соединение 4	ATR ATRIP(h)	10	353,4	97	1	-0,860	0,997
Соединение 3	ATR ATRIP(h)	10	196,1	98	-3	-0,776	0,999
Соединение А	ATR ATRIP(h)	10	<1	нд	НД	НД	НД

#### Пример 14. Определение активности АТМ.

Оцененные значения IC50 составляют (получены с использованием метода STANDARD KINASE-PROFILER).

		Габлица 5
Соединение	Киназа	IC50 (нМ)
Соединение б	ATM(h)	>10000
Соединение 2	ATM(h)	4817
Соединение 5	ATM(h)	>10000
Соединение 1	ATM(h)	3864
Соединение 4	ATM(h)	6869
Соединение 3	ATM(h)	>10000
Соединение А	ATM(h)	42

Пример 15. Выявление общей и фосфо-ATR вестерн-блот анализом.

Как проиллюстрировано на фиг. 17, клетки DMS-114 рака легкого подвергали воздействию либо только гемцитабина [16 нМ], либо только ингибитора ATR (соединение A или соединение 5 [1 мкМ]) или их комбинации in vitro. Через 1, 3, 6 и 24 ч получали белковые лизаты целых клеток с использованием содержащего 2% ДСН буфера для лизиса клеток и хранили их при -80°C до тех пор, пока все образцы собирали вместе и анализировали одновременно анализом вестерн-блоттинга. Антителами, приобретенными у компании Cell Signaling Technology (см. ниже раздел материалов и методов), выявляли следующие интересующие белки и фосфопротеины: общая и фосфо-ATR (S428), фосфо-CHK1 (S317 и S345), γH2AX, бета-актин.

Результаты на фиг. 17. Сигнал общей и фосфо-АТК сильно снижается с течением времени при добавлении любого из двух ингибиторов АТК (соединение A и соединение 5), но не при обработке контролем или одним гемцитабином (например, сравните дорожки 1, 2 с 3, 4 или 5, 6 через 24 ч). В ответ на гемцитабин образование сигнала фосфо-CHK1 (S317 и S345) значимо увеличивается в течение периода времени 24 ч. Добавление любого из применяемых ингибиторов АТК (соединение A и соединение 5) прерывает сигнал фосфорилирования CHK1. Снижение образования белка АТК и последующей передачи сигнала CHK1 обоими ингибиторами подтверждает специфические целевые воздействия обеих молекул. Что более важно, гипотеза авторов изобретения заключается в том, что контрольная точка клеточного цикла, управляемая передачей сигнала фосфорилирования CHK1, которая предположительно ведет к остановке клеточного цикла и репарации повреждения ДНК, индуцирует гибель клеток путем накопления повреждений ДНК. Увеличение сигнала γH2AX может наблюдаться как идентификатор измерения увеличенной токсичности и накопления повреждений ДНК.

Клеточная культура.

Выращивали клетки U2OS и другие клетки в среде (RPMI) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и антибиотиков. Получали изображения и проводили совместную замедленную съемку линий клеток NucLight с красной флуоресценцией, как рекомендовано компанией Essen Bioscience Inc. с использованием протоколов для лентивирусных частиц, инфицирования и отбора с пуромицином.

Антитела и анализы вестерн-блот.

Все мишени и фосфоспецифические антитела, приобретенные в компаниях Cell Signaling и/или Epitomics, использовали в разведениях 1:1000. Перечень всех антител представлен в табл. 6. Использовали протоколы стандартного вестерн-блота на основе антител и иммуногистохимических исследований. Вкратце, для сбора лизата целых клеток для проведения вестерн-блоттинга применяли буфер на основе 2% ДСН для лизиса клеток. Вторичные антитела и протоколы для окрашивания приобретали у LiCor Biosciences и/или BD Bioscience и следовали в соответствии с описанием этих поставщиков.

# 039513

		Таблица 6
Мишень	Компания	№ в каталоге
	Cell Signaling	2790
AIN	Technology	2790
	Cell Signaling	2052
AIR ΨΟCΨΟ (5428)	Technology	2000
CIIIZ1 hooko (CO17)	Cell Signaling	12202
CHKI ΦΟCΦΟ (2317)	Technology	12302
CIIVI Acado (C245)	Cell Signaling	2240
CHKI ΦΟCΦΟ (5343)	Technology	2340
HODY backs (C120)	Cell Signaling	0710
ΗΖΑΧ ΦΟΟΦΟ (2139)	Technology	9718
<i>c</i>	Cell Signaling	4070
оета-актин	Technology	4970

Протокол лизиса целых клеток

Выращивали клетки и обрабатывали их в масштабе чашек Петри диаметром 6 см. У выращенных клеток удаляли среду и быстро заменяли ее ледяным ФСБ. Затем ФСБ заменяли 250 мкл лизирующего буфера с 2% ДСН. После 5 мин инкубации лизированные клетки счищали и переносили на микроцентрифужную спин-колонку гомогенизатора клеточного лизата (QIAshredder, Qiagen, № 79656 по кат.). Затем фильтрат переносили на центрифужную фильтрующую колонку с размером пор 0,2 мкм (Nanosep MF 0.2 m, Pall, № ОDM02C34 по кат.). После чего образцы хранили при -80°С.

Модифицировали содержащий 2% ДСН лизирующий буфер (табл. 7) в соответствии с публикацией Steven et al., "Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways", Nat Med 10, № 12 (December 2004): 1390-1396.

	Таблица 7
Титрованное рН=6,8	Конечная конц.
Основание Trizma	50 мМ
ДСН	2%
Глицерин	5%
ЭДТК	5 mM
NaF	1 MM

Пример 16. Расширенный набор для скрининга киназ (359).

Основными мишенями из 359 были следующие: ALK, ARK, c-MER, CLK1, DYRK, GSK3a, GSK3b, FLT2, FLT3, MLK1, SIK2, TNIK и YSK4.

				таолица о
Киназа	Соединение 5 (М)	Log IC <sub>50</sub>	Киназа	нМ
ALK1/ACVRL1	3,57E-08	-7,45	ALK1/ACVRL1	35,7
ALK2/ACVR1	1,66E-08	-7,78	ALK2/ACVR1	16,6
ARK5/NUAK1	1,68E-08	-7,78	ARK5/NUAK1	16,8
CLK1	1,34E-07	-6,87	CLK1	134
CLK4	8,86E-08	-7,05	CLK4	88,6
DDR1	1,91E-07	-6,72	DDR1	191
DYRK2	7,18E-08	-7,14	DYRK2	71,8
FLT4/VEGFR3	6,34E-08	-7,20	FLT4/VEGFR3	63,4
GSK3a	5,73E-09	-8,24	GSK3a	5,73
GSK3b	6,30E-08	-7,20	GSK3b	63
MLK1/MAP3K9	1,13E-08	-7,95	MLK1/MAP3K9	11,3
MLK2/MAP3K10	9,58E-09	-8,02	MLK2/MAP3K10	9,58
MLK3/MAP3K11	5,90E-09	-8,23	MLK3/MAP3K11	5,9
PIM1	7,26E-08	-7,14	PIM1	72,6
PKCmu/PRKD1	1,34E-07	-6,87	PKCmu/PRKD1	134
PKD2/PRKD2	1,57E-07	-6,80	PKD2/PRKD2	157
RET	7,74E-08	-7,11	RET	77,4
SIK2	1,49E-07	-6,83	SIK2	149
TNIK	1,10E-07	-6,96	TNIK	110
YSK4/MAP3K19	2,92E-08	-7,53	YSK4/MAP3K19	29,2
		1		

Таблица 8

Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами реализации, понятно, что возможны дополнительные модификации и предполагается, что данная заявка включает любые вариации, применения или адаптации изобретения, согласующиеся в общем случае с принципами изобретения и включающие такие отклонения от настоящего описания, которые относятся к компетенции известной или общепринятой практики в области техники, к которой относится изобретение, и применимые к существенным признакам, установленным в данном документе.

Пример 17. Данные использования соединения А в качестве препарата сравнения.

Выполняли анализы гибели и роста клеток, комбинируя соединение A и гемцитабин в различных концентрациях на клетках U2OS. Данные результаты сравнивали с предыдущим прогнозом роста и гибели клеток для комбинации этих двух соединений (фиг. 18A). Количество живых и апоптических клеток также определяли для ряда концентраций соединения A (1 мкМ) и гемцитабина (0,04 мкМ) на клетках USO2 (фиг. 18B). Результаты демонстрируют, что комбинация соединения A и гемцитабина лучше стимулирует гибель клеток, чем любое соединение самостоятельно.

Исследовали также соединение A самостоятельно и в комбинации с SN38 в ряде концентраций (соответственно 1 и 0,2 мкМ) на нескольких линиях клеток рака легкого (NCI-H520 и NCI-H596) и клетках U2OS с отслеживанием количества клеток с течением времени. Результаты указывают, что комбинация является более эффективной для поддержания или снижения количеств клеток с течением времени, чем либо соединение A, либо SN38 по отдельности (фиг. 19).

Выполняли также анализы роста in vitro с соединением A и SN38 в комбинации и самостоятельно на линии клеток MS751 рака шейки матки. В данных анализах in vitro продемонстрировано снижение количества клеток с течением времени в комбинации по сравнению с любым соединением отдельно (фиг. 20).

Пример 18. Сравнение соединения А и соединения 5 в комбинации с гемцитабином или SN38.

Анализы роста и гибели клеток in vitro выполняли, комбинируя соединение A или соединение 5 с гемцитабином при различных концентрациях на линиях клеток U2OS, H358 и A549. Результаты показывают концентрации каждого соединения и гемцитабина, которые требуются для запуска гибели клеток (фиг. 21A). На клетках USO2 и H358 также исследовали также ряд концентраций соединения 5 и гемцитабина или соединения A и гемцитабина. Во всех случаях относительная пролиферация клеток снижалась для комбинаций по сравнению с лекарственными средствами по отдельности (фиг. 21B, 21C).

Использовали соединение А или соединение 5 в комбинации с SN38 на клетках А549. Рост клеток измеряли с течением времени и в диапазоне концентраций. Выделена кривая роста при оптимальной концентрации соединения/SN38 (фиг. 22А). В диапазоне концентраций измеряли относительный показатель пролиферации клеток А549 либо только соединения А, либо только соединения 5 (фиг. 22В).

Определяли значения IC50 на нескольких линиях клеток с использованием ряда концентраций гемцитабина с различными концентрациями соединения А или соединения 5 (фиг. 23). Сводные данные по линиям клеток рака легкого, которые восприимчивы к соединению А или соединению 5 в комбинации с гемцитабином или SN38, представлены на фиг. 24.

Пример 19. Целевые и нецелевые сравнения соединения А и соединения 5.

Исследовали различные ингибиторы ATR на их способность ингибировать ATR (целевая мишень) и ATM (нецелевая мишень). Ингибирование выражено как IC50 в нМ (фиг. 25А). С соединением А или соединением 5 исследовали также дополнительные "нецелевые" киназы (фиг. 25В).

Выполняли целевое исследование с соединением А или соединением 5 на клетках А549 рака легкого (фиг. 26А, 26В), клетках Н23 рака легкого (фиг. 26С, 26D) и клетках DMS-114 (фиг. 26Е, 26F). Фосфорилирование S345 CHK1, показатель ингибирования ATR измеряли вестерн-блот анализом. Каждое соединение при этом применяли при фиксированной концентрации гемцитабина.

Дополнительно выполняли целевые исследования на линиях клеток HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC и DMS-114. С диапазоном концентраций соединения А или соединения 5 использовали набор концентраций SN38. Анализом вестерн-блота исследовали и измеряли различные параметры целевой активности мишени (фиг. 27А, 27В).

Определяли профили стадий клеточного цикла клеток SUM149 через 24 ч после добавления SN38 и соединения А или соединения 5 (фиг. 28). По сравнению с контролями при получении комбинации лекарственных средств больший процент клеток останавливается на фазе G2.

Пример 20. Сравнение липосомальных составов соединения А и соединения 5 в комбинации с ММ-398.

Для измерения воздействий лс-соединения А или лс-соединения 5 в комбинации с MM-398 применяли модели ксенотрансплантата легкого DMS-114. С двумя разными дозировками соединения А или соединения 5 (20 или 80 мг/кг) использовали набор дозировок MM-398 (5 мг/кг). Воздействия обработки анализировали измерением уровней фосфорилирования S345 CHK1 (фиг. 29).

На линии клеток SUM-149 также исследовали воздействия лс-соединения A с MM-398. Воздействия обработки анализировали измерением уровней фосфорилирования RPA2, DNAPK, CHK1 и γH2AX. Лс-соединение 5 также исследовали без комбинации с MM-398 (фиг. 30A-C).

Пример 21. Противоопухолевая эффективность и переносимость in vivo лс-соединения 5, полученного с использованием ТЭА-СОС, в отношении ксенотрансплантатов трижды негативного рака молочной железы у мышей.

На модели линии клеток SUM-149 человека (трижды негативный рак молочной железы) изучали противоопухолевую эффективность липосом, нагруженных ингибирующим ATR соединением 5 в комбинациях с MM-398 (липосомальный иринотекан).

Клетки получали из Американской коллекции типовых культур (г. Роквилл, штат Мэриленд, США) и размножали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата при 37°С, 5% CO<sub>2</sub> согласно рекомендациям поставщика. Бестимусных гомозиготных самцов мышей nu/nu NCR (возраст 4-5 недель, масса около 16 г) получали из компании Charles River. Мышам в правый бок подкожно инокулировали 0,1 мл суспензии, содержащей 107 клеток, суспендированных в ФСБ с добавкой 30% матригеля. Когда опухоли достигали размера от 150 до 350 мм<sup>3</sup> животных определяли в группы лечения в соответствии со следующей методикой. Животных распределяли в соответствии с размером опухоли и разделяли на шесть категорий снижения размера опухоли. Формировали четыре группы лечения по десять животных/группу путем случайного отбора по одному животному из каждой категории размера таким образом, чтобы в каждой группе лечения были одинаковым образом представлены все размеры опухолей. Через интервалы по 7 суток животные получали пять инъекций в хвостовую вену следующих препаратов

1) ГЭПЭС-забуференный солевой раствор с рН 6,5 с последующим контролем;

2) MM-398 в дозе 5 мг/кг на инъекцию;

3) липосомальное соединение 5 по 80 мг/кг на инъекцию;

4) ММ-398 с последующими инъекциями липосомального соединения 5 с интервалом 24 ч;

5) ММ-398 с последующими инъекциями свободного неинкапсулированного ингибирующего ATR соединения А. Липосомы для инъекций готовили, как описано в примере 10.

Дважды в неделю отслеживали массу животных и размер опухоли. Прогрессирование опухолей отслеживали методом пальпации и измерениями опухолей штангенциркулем вдоль наибольшей (длина) и наименьшей (ширина) оси два раза в неделю. По измерениям штангенциркулем дважды в неделю определяли размеры опухолей с использованием формулы

# Объем опухоли=[(длина)×(ширина)<sup>2</sup>]/2

Для оценки, связанной с лечением токсичности, также два раза в неделю взвешивали животных. Когда опухоли в группе достигали 10% от массы тела мыши, животных в группе подвергали эвтаназии. На графике вместе отмечали средние значения объемов опухолей среди группы и сравнивали их с течением времени.

Как продемонстрировано на фиг. 31, липосомальное ингибирующее ATR соединение 5 значимо улучшило противоопухолевую эффективность MM-398 на данной модели ксенотрансплантата. Комбинированное лечение липосомальным ингибитором ATR и MM-398 не влияло на массу тела животных (фиг. 32). Пример 22. Определение профилей линий клеток и сравнение с данными Incucyte.

Определяли профили набора флуоресцентно меченых линий клеток по отношению к различным белкам, вовлеченным в механизм повреждения ДНК. Исходные линии раковых клеток трансдуцировали лентивирусом NucLight Red и отбирали их с помощью пуромицина. Измеряли базовые уровни белков и количественно определяли их вестерн-блот анализом. После выполнения количественного определения сигнал ФД-маркеров нормализировали по сигналу бета-актина. Уровни белков коррелировали с "интегральным показателем" линии клеток, величиной клеточного ответа in vitro на соединение 5 и обработку химиотерапевтической комбинацией. Интегральный показатель можно рассчитывать следующим образом.

Как проиллюстрировано на фиг. 33 и 34, линии клеток высевали на 96-луночные планшеты и каждый планшет подвергали воздействию схемы доз соединения 5 и химиотерапии в течение 4 суток. Измеряли динамическую жизнеспособность клеток с использованием анализа Incucyte. Для каждой комбинации лекарственных средств в схеме доз рассчитывали конкретный интегральный показатель комбинации доз путем суммирования площади под нормализированной кривой пролиферации клеток. Конкретный интегральный показатель линии клеток подсчитывали усреднением четырех наибольших показателей по данной схеме доз.

Как проиллюстрировано на фиг. 35 и 36, наблюдали, что для линий клеток рака легкого после воздействия соединения 5 и SN38 оба значения базальных уровней белка MRE11 и базальных уровней ATM значимо коррелировали с интегральными показателями данных линий клеток. У раковых клеток легкого, у которых был нарушен фоновый уровень p53 и которых подвергали воздействию соединения 5 и SN38, интегральный показатель коррелировал с уровнями белков NBS, MRE11 и RAD50. Клетки с "нарушенным уровнем p53" - это клетки с ненулевыми базальными уровнями белка p53 (у большинства клеток уровни p53 заметны на вестерн-блотах только после обработки) (см. фиг. 37, 38 и 39).

Пример 23. Эксперимент по определению сигнала. Соединение 5 по сравнению с соединением А в комбинации с SN38. 6 Различных ФД-маркеров.

Как проиллюстрировано на фиг. 40-44, анализом вестерн-блот количественно определяли фармакодинамические маркеры pChk1, pRPA2, pATR, pDNAPK, pChk2 и γH2AX после воздействия на линии раковых клеток различных доз соединения 5 и соединения А в комбинации с SN38. Клетки HCC70, DMS114, MDAMB468, NCIH1299 и NCIH460 высевали на 12-луночные планшеты, обеспечивая инкубирование в течение ночи, затем подвергали воздействию SN38 и/или ингибитора ATR. Через 24 ч воздействия лекарственного средства клетки лизировали для проведения вестерн-блотинга. После выполнения количественного определения сигнал ФД-маркеров нормализировали по сигналу бета-актина.

Пример 24. Эксперимент по определению сигнала. Соединение 5 по сравнению с соединением А в комбинации с гемцитабином. 3 Различных ФД-маркера.

Как проиллюстрировано на фиг. 45-50, определяли профили шести флуоресцентно меченых линий клеток по отношению к различным белкам, вовлеченным в механизм повреждения ДНК, после воздействия ингибитора ATR и/или гемцитабина. Исходные линии раковых клеток трансдуцировали лентивирусом NucLight Red и отбирали их с помощью пуромицина. Анализом вестерн-блот количественно определяли фармакодинамические маркеры pChk1, pATR и γH2AX после воздействия на линии раковых клеток различных доз соединения 5 и соединения A в комбинации с 16 нМ гемцитабина. Клетки A549, NCIH23, DMS114, U2OS, HCC827 и NCIH460 высевали на 12-луночные планшеты, обеспечивая инкубирование в течение ночи, затем подвергали воздействию SN38 и/или ингибитора ATR. Через 6 или 18 ч воздействия лекарственного средства клетки лизировали для проведения вестерн-блотинга. После выполнения количественного определения сигнал ФД-маркеров нормализировали по сигналу бета-актина.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор протеинкиназы атаксии-телеангиэкстазии и Rad3-родственного белка (ATR), представляющий собой соединение формулы (Ia) или его фармацевтически приемлемую соль



где R' представляет собой NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо представляет собой  $C_1$ - $C_4$ -алкил. 2. Соединение формулы 5 или его фармацевтически приемлемая соль



3. Соединение формулы 6 или его фармацевтически приемлемая соль



4. Липосомная композиция, содержащая ингибитор протеинкиназы ATR, инкапсулированный в липосому, где ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение A или его фармацевтически приемлемую соль





5. Липосомная композиция, содержащая ингибитор протеинкиназы ATR, инкапсулированный в липосому, где ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль



где R представляет собой

i) **к**<sup>1</sup>, где А<sup>1</sup> либо отсутствует, либо представляет собой С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>-алкил и R<sup>1</sup> представляет собой С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>-алкиламино;

ii) -N(H) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил)-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил;

ііі) -(G)-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> каждый независимо означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, G означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил и G может

быть дополнительно замещен C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом; или

iv)

<sup>С</sup> R<sup>d</sup>, где R<sup>c</sup> и R<sup>d</sup> каждый независимо означает C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

6. Липосомная композиция по п.5, отличающаяся тем, что ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из



7. Липосомная композиция по п.5, отличающаяся тем, что ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из



8. Липосомная композиция по любому из пп.4-7, где липосома включает холестерин.

Соединение 5

И

Соелинение 6

039513

9. Липосомная композиция по любому из пп.4-8, отличающаяся тем, что липосома содержит гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (ГСФХ) и холестерин.

10. Липосомная композиция по п.8 или 9, отличающаяся тем, что липосома дополнительно содержит ПЭГ(2000)-дистеароилглицерин (ПЭГ-ДСГ).

11. Липосомная композиция по п.10, отличающаяся тем, что липосома содержит ГСФХ, холестерин и ПЭГ-ДСГ в молярном соотношении 3:2:0,15.

12. Липосомная композиция по любому из пп.4-11, где липосома содержит один или более фосфолипидов.

13. Липосомная композиция по любому из пп.4-11, где липосома содержит 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДСФХ).

14. Липосомная композиция по п.5, отличающаяся тем, что ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение 1



(Соединение 1)

15. Липосомная композиция по п.4 или 5, имеющая период полувыведения из плазмы по меньшей мере 5 ч у мышей.

16. Липосомная композиция по п.5, отличающаяся тем, что ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение 5



или его фармацевтически приемлемую соль.

17. Липосомная композиция по п.5, отличающаяся тем, что ингибитор протеинкиназы ATR представляет собой соединение 6



или его фармацевтически приемлемую соль.







Фиг. 4












Фиг. 17





Фиг. 18А









Фиг. 21А



Фиг. 21В





- 42 -

Фикс. конц. гемцитабина [3,2 нМ]

Конц. ATRi, серийн. развед: 3; 1; 0,11; 0,33; 0,004 мкМ



Гемцитабин	Соединение А	Соединение 5
Отвечающие	A549, HCC827, H2170, H358, H460	A549, HCC827, H2170, H358, H460
Неотвечающие	H2170, H358, H596	H2170, H358, H596

SN38	Соединение А	Соединение 5		
Отвечающие	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6	A549, DMS-114, H1299, H23, M460, Calu-6		
Неотвечающие	Calu-6, H1993, H23, H596	Calu-6, H1993, H23, H596		

Фиг. 24

Киназа	ATR IC <sub>50</sub> (нМ)	АТМ IC <sub>50</sub> (нМ)
Соединение 6	470,8	>10000
Соединение 2	139,8	4817
Соединение 5	233,9	>10000
Соединение 4	353,4	6869
Соединение 3	196,1	>10000
Соединение А	<1*	42
Соединение 1 ***	49,6 **	3864

EuroFin, UK, cell freesystem

Лит. ссылка \*KI < 0,2 нМ \*\*KI = 6 нМ IC50 = 120 нМ \*\*\* исследование прекращено

# Фиг. 25А

Киназа	Соединение 5 IС <sub>50</sub> (нМ)	Соединение А IС₅о (нМ)
GSK3a	206	126
GSK3β	876	210
MLK1	74	59
MLK2	91	76
		EuroFin, UK, cell freesystem

Фиг. 25В

# Клетки А549

039513



0.02 0.00

0.001

-0-

0.01

0.1 **A**  1

Соединение 5 [мкМ] и фикс. Гем. [16 нМ], комб. Соединение А [мкМ] и фикс. Гем. [16 нМ], комб. Фиг. 26В

# Клетки Н23









момент времени 6 ч

момент времени 18 ч

















Экспрессия белка MRE11 и корреляция интегрального показателя SN38 (ATRi/SN38 комб.; только легкого)



Экспрессия белка АТМ И КОРРЕЛЯЦИЯ ИНТЕГРАЛЬНОГО показателя SN38





# Экспрессия БЕЛКА NBS И КОРРЕЛЯЦИЯ ИНТЕГРАЛЬНОГО



(ATRi/SN 38 комб.; нарушенный уровень p53; только



## Экспрессия белка MRE11 и корреляция интегрального показателя SN38











Фиг. 40А





Фиг. 40В





Н1299, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика S345 pCHK1



Фиг. 40С





Фиг. 40D





#### Н1299, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика T68 рCHK2



Фиг. 40Е





Фиг. 40F



#### Н460, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика S428 pATR



Фиг. 41А





Фиг. 41В



Н460, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика S345 pCHK1



Фиг. 41С





Фиг. 41D









Фиг. 41Е



Фиг. 41F







Фиг. 42А





Фиг. 42В





DMS-114, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика S345 pCHK1







Фиг. 42D









Фиг. 42Е



Фиг. 42F







Фиг. 43А









НСС-70, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика S345 рCHK1

Фиг. 43D



## HCC-70, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. ДИНАМИКА T68 рCHK2



HCC-70, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика уН2АХ



Фиг. 43F









Фиг. 44А





Фиг. 44В





MDA-MB468, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Линамика S345 рСНК1

Фиг. 44D









Фиг. 44Е

MDA-MB468, SN38, Соединение 5 или соединение А, комб. Динамика уH2AX



Фиг. 44F





момент времени 6 ч



Фиг. 46

момент времени 18 ч

уН2АХ b-актин





Ингибирование СНК1



Кратность измен. образов. сигнала фосфорил.


Ингибирование RPA2



