

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039621**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.17

(21) Номер заявки
201990305

(22) Дата подачи заявки
2017.07.21

(51) Int. Cl. *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/4353 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ BCL-2 ИНГИБИТОРА И MCL-1 ИНГИБИТОРА, ИХ ПРИМЕНЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 16180918.1; 16306420.7; 62/464,554;
62/517,252

(32) 2016.07.22; 2016.10.28; 2017.02.28;
2017.06.09

(33) EP; EP; US; US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/EP2017/068453

(87) WO 2018/015526 2018.01.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ (FR);
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Вэй Эндрю, Муджаллед Дония,
Помилио Джованна (AU), Мараньо
Ана Летисия, Женест Оливье,
Клаперон Одри (FR), Макке Хайко
(CH), Халилович Энсар, Портер Дейл,
Моррис Эрик, Ван Ючжэнь, Сангхави
Снеха (US), Мистри Пракаш (CH)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(56) WO-A1-2015011399

L LI ET AL.: "Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1", LEUKEMIA., vol. 29, no. 8, 17 April 2015 (2015-04-17), pages 1702-1712, XP055314197, US ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2015.99, the whole document

D. C. PHILLIPS ET AL.: "Loss in MCL-1 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199)", BLOOD CANCER JOURNAL, vol. 5, no. 11, 13 November 2015 (2015-11-13), page e368, XP055314196, DOI: 10.1038/bcj.2015.88, the whole document

WO-A1-2015097123

(57) Изобретение относится к комбинации, содержащей BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор, и к применению указанной комбинации для лечения злокачественного новообразования.

039621 B1

039621 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к комбинации BCL-2 ингибитора и MCL1 ингибитора. Изобретение также относится к применению указанной комбинации для лечения злокачественного новообразования, в особенности лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, нейроblastомы и рака лёгкого и более специфически острого миелоидного лейкоза, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, лимфомы из клеток зоны мантии, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и мелкоклеточного рака лёгкого. Также обеспечиваются фармацевтические препараты, подходящие для введения таких комбинаций.

Предпосылки создания изобретения

Апоптоз представляет собой строго регулируемый путь гибели клеток, который инициируется различными цитотоксическими стимулами, включая онкогенный стресс и химиотерапевтические средства. Было показано, что уклонение от апоптоза является отличительным признаком злокачественного новообразования и что эффективность многих химиотерапевтических средств зависит от активации внутреннего митохондриального пути. Три разные подгруппы белков BCL-2 семейства контролируют внутренний апоптотический путь: (I) проапоптотические BH3 (BCL-2 гомология 3)-только белки; (II) способствующие выживанию представители, такие как сам BCL-2, BCL-XL, Bcl-w, MCL1 и BCL-2a1; и (III) проапоптотические эффекторные белки BAX и BAK (Czabotar и др., *Nature Reviews Molecular cell biology* 2014 том 15:49-63). Сверхэкспрессия анти-апоптотических представителей BCL-2 семейства наблюдается при многих злокачественных новообразованиях, в особенности при злокачественных заболеваниях системы крови, таких как лимфома из клеток зоны мантии (MCL), фолликулярная лимфома/диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (FL/D) и множественная миелома (Adams and Cory *Oncogene* 2007 том 26:1324-1337). Фармакологическое ингибирование анти-апоптотических белков BCL-2, BCL-XL и Bcl-w с помощью разработанных недавно BH3-миметических лекарственных средств, таких как ABT-199 и ABT-263, является терапевтической стратегией для индуцирования апоптоза и вызывает регрессию опухоли при злокачественном новообразовании (Zhang и др., *Drug Resist Updat* 2007 Vol 10(6):207-17). Тем не менее, проводятся наблюдения и исследования относительно механизмов резистентности к этим лекарственным средствам (Choudhary GS и др., *Cell Death and Disease* 2015 том 6, e1593; doi:10.1038/cddis.2014.525).

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой стремительно развивающееся смертельное злокачественное заболевание крови, возникающее при клоновой трансформации гемопоэтических стволовых клеток, что приводит к параличу нормального функционирования костного мозга и смерти вследствие осложнений от абсолютной панцитопении. AML отвечает за 25% всех лейкозов у взрослых, и самый большой коэффициент заболеваемости наблюдается в Соединенных Штатах Америки, Австралии и Европе (WHO. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer). Во всем мире, ежегодно диагностируется приблизительно 88 тыс. новых случаев. AML продолжает сохранять наиболее низкий коэффициент выживаемости из всех лейкозов, с предполагаемым 5-ти летним выживанием только 24%. Несмотря на то, что стандартная терапия для AML (цитарабин в комбинации с антрациклинами) была разработана более 4 десятилетий тому назад, введение успешных нацеленных терапий для этого заболевания остается труднодостижимой целью. Кроме того, остается потребность в возможности лечения без химиотерапии для пациентов с AML. Концепция нацеленной терапии при AML была приостановлена вследствие установления того, что в это заболевание вовлечена мультиклональная иерархия, с быстрым разрастанием лейкоэмических субклонов в качестве основной причины резистентности к лекарственным средствам и рецидивирования заболевания (Ding L. и др., *Nature* 2012 481:506-10). В недавних клинических исследованиях была показана эффективность BCL-2 ингибиторов для лечения AML (Konopleva M и др., *American Society of Hematology* 2014:118). Несмотря на то, что эти ингибиторы являются клинически активными, вероятно, что другие представители BCL-2 семейства будут нуждаться в нацеливании для усиления суммарной эффективности при AML. Дополнительно к BCL-2, MCL1 также был идентифицирован в качестве важного регулятора клеточного выживания при AML (Glaser SP и др., *Genes & development* 2012 26:120-5).

Множественная миелома (MM) представляет собой редкое и неизлечимое заболевание, которое характеризуется накоплением клонированных плазмочитов в костном мозге (BM) и отвечает за 10% всех злокачественных заболеваний системы крови. В Европе, каждый год регистрируется приблизительно 27 тысяч 800 новых случаев. Благодаря доступности новых средств за последние годы, включая бортезомиб и леналидомид, и трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT), был улучшен коэффициент выживаемости. Тем не менее, ответная реакция на эти новые средства часто является не долгосрочной и становится очевидной необходимость в новых лечениях, в особенности для рецидивирующих/трудно поддающихся лечению пациентов и пациентов с неблагоприятным прогнозом (неблагоприятным цитогенетическим профилем). Последние исследования подтверждают перспективную активность BCL-2 ингибиторов в подгруппе пациентов с множественной миеломой (Touzeau C., Dousset C., Le Gouill S., и др. *Leukemia*. 2014; 28(1):210-212). MCL1 также был идентифицирован в качестве важного регулятора клеточного выживания при множественной миеломе (Derenne S., Monia B., Dean NM, и др. *Blood*. 2002;100(1): 194-199; Zhang B., Gojo I, Fenton RG. *Blood*. 2002; 99(6): 1885-1893).

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) представляет собой наиболее частый тип (25-35%) неходжкинской лимфомы с 24 тыс. новых пациентов/год. DLBCL представляет собой гетерогенное заболевание с свыше двенадцати подтипами, включая двойную-hit/MYC транслокацию, Активированные В-клетки (ABC) и Зародышевый центр В-клеток (GCB). С помощью современной иммунной химиотерапии (R-СНОР) лечат приблизительно 60% пациентов с DLBCL, но для оставшихся 40% существует незначительный возможный метод лечения и прогноз является плохим. Следовательно, существует значительная медицинская потребность в повышении показателей эффективности лечения и клинических исходов с высоким риском DLBCL, таким как ABC подтип (35% от DLBCL), который проявляет конститутивную активацию способствующего выживанию NF-κB пути.

Нейробластома (NB) представляет собой наиболее часто встречающуюся внечерепную солидную опухоль у новорожденных и детей, составляющую 8-10% всех опухолей у детей, которая в настоящее время классифицирована на категории низкого, промежуточного или высокого риска. На нее приходится около 15% всех смертельных исходов, связанных со злокачественными новообразованиями, у пациентов детского возраста. Частота NB составляет 10,2 случаев на миллион детей в возрасте до 15 лет, и ежегодно регистрируется около 500 новых случаев. Средний возраст постановки диагноза составляет 22 месяца. Исходы у пациентов с NB улучшаются неизменно в течение последних 30 лет с 5-летними коэффициентами выживаемости, возрастающими от 52 до 74%. Тем не менее, по имеющимся оценкам предполагают, что у 50-60% пациентов в группе высокого риска развивается рецидив, и, вследствие этого у них наблюдается только незначительное снижение смертности. Медиана времени до рецидива составляет 13,2 месяца и 73% тех, у которых наступает рецидив, имел возраст 18 месяцев или старше. Взятые в совокупности NB суммарные коэффициенты выживаемости остаются полностью неприемлемыми (~20% через 5 лет), несмотря на более агрессивные терапии (Colon и Chung, *Adv Pediatr* 2013 58: 297-311). Основными видами лечения являются химиотерапия, хирургическая резекция и/или лучевая терапия. Тем не менее, у многих агрессивных NB развилась резистентность к химиотерапевтическим средствам, что сохраняет достаточно высокой вероятность рецидивирования (Pinto и др., *J Clin Oncol* 201533: 3008-11). Стандартами лечения для NB в зависимости стратификации риска являются часто карбоплатин, цисплатин циклофосфамид, доксорубин, этопозид, цитокины (GM-CSF и IL2) и винкристин. Ухудшение после исходной ответной реакции на химиотерапию является основной причиной неуспешного лечения, в особенности при высоком риске NB.

Химиорезистентность может развиваться вследствие активации способствующих выживанию BCL-2 белков (например, BCL-2 и MCL1 белков). NB экспрессирует высокие уровни BCL-2 и MCL1 и низкий уровень BCL-XL. Ингибирование BCL-2 сенситизирует клетки к гибели и индуцирует NB регрессию опухоли *in vivo* (Ham и др., *Cancer Cell* 29:159-172). Антагонизмы BCL-2 и MCL1 восстанавливают химиотерапию при высоком риске NB (Lestini и др., *Cancer Biol Ther* 2009 8:1587-1595; Tanos и др., *BMC Cancer* 2016 16:97). Таким образом, существует сильная целесообразность комбинировать BCL-2 и MCL1 ингибиторы у не леченных ранее или резистентных пациентов.

Настоящее изобретение обеспечивает новую комбинацию BCL-2 ингибитора и MCL1 ингибитора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что с развитием эффективных низкомолекулярных нацеленных BCL-2 и MCL1, высоко синергетическая проапоптотическая активность обнаруживается в первичных человеческих AML образцах (фиг. 2A и 17), а также в AML (фиг. 9, 13 и 14), множественной миеломе (пример 4), лимфоме (фиг. 4 и 12), нейробластома (фиг. 10), T-ALL, B-ALL клеточных линиях (фиг. 11) и в клеточных линиях мелкоклеточного рака лёгкого (фиг. 15 (a)-(e)). Нами также было показано, что комбинированное BCL-2 и MCL1 нацеливание *in vivo* эффективно в переносимых дозах на AML и лимфомных моделях ксенотрансплантатов у мышей и крыс (фиг. 2, 5, 6, 7, 8 и 16) и существенно повышает время до развития рецидива при AML (фиг. 2B и 2C). Кроме того, в клоногенных исследованиях нами было показано, что BCL-2+MCL1 нацеливание специфически токсичное для лейкозогенных клеток, но не для нормальных гемопоэтических стволовых клеток (фиг. 3), в отличие от предшествующих экспериментов нацеливания MCL1 гена у мышей. Перед разработкой этих эффективных и селективных ингибиторов осуществимость нацеливания обеих BCL-2 и MCL1, остается неопределенной. Предшествующие модели делеций, специфические для клональных линий, указывают на потенциальный риск для сердечной (Wang X и др., *Genes & development*. 2013; 27(12): 1351-1364; Thomas RL и др., *Genes & development*. 2013; 27(12): 1365-1377), гранулоцито/гемопоэтической (Opferman J и др., *Science's STKE*. 2005; 307(5712):1101; Dzhagalov I. и др., *Blood*. 2007; 109(4): 1620-1626; Steimer DA и др., *Blood*. 2009; 113(12):2805-2815), тимоцитной (Dunkle A. и др., *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(6):994-1002), нейронной (Arbour N. и др., *Journal of Neuroscience*. 2008; 28(24): 6068-6078) и печеночной функции (Hikita H. и др., *Hepatology*. 2009; 50(4): 1217-1226; Vick B и др., *Hepatology*. 2009; 49(2): 627-636), что развивается вследствие длительной абляции MCL1. Несмотря на эти потенциальные проблемы, недавно было показано, что еженедельная, два раза в неделю и даже ежедневная (в течение 5 последовательных дней) внутривенная доставка нового потенциального фармакологического ингибитора MCL1 с коротким действием хорошо переносится и активна по отношению к различным злокачественным новообразованиям *in vivo*, включая AML (Kotschy A. и др., *Nature*. 2016; 538(7626): 477-482; WO 2015/097123). Короткий

период полужизни MCL1 белка может предоставлять достаточно времени для его регенерации в критических органах, таким образом, предоставляя возможность физиологической толерантности для MCL1 ингибиторов с коротким временем воздействия (Yang T и др., Journal of cellular physiology. 1996; 166(3): 523-536). До настоящего времени пульсирующее ингибирование BCL-2 и MCL1 имитирует эффект, подобный к действию лекарственного средства, который не был возможен при использовании подходов генетической инженерии. Исследования с использованием BCL-2 и MCL1 ингибиторов в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают экспериментальное подтверждение концепции о том, что прерывистое воздействие для этих лекарственных средств может быть достаточным для запуска апоптоза и клинической ответной реакции для многих высоко чувствительных заболеваний, таких как AML, без сопутствующей токсичности на основные системы органов.

Синергетический эффект нацеливания обоих BCL-2 и MCL1 *in vitro* и *in vivo* и нетоксичность на нормальную функцию костного мозга при нацеливании обоих анти-апоптотических белков только была показана с помощью комбинации эффективных низкомолекулярных ингибиторов. Эти аспекты не могут быть предположены вследствие результатов экспериментов нацеливания генов, которые могут предсказывать, что MCL1 делеция плохо переносится гемопоэтическими стволовыми клетками.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинации для лечения злокачественного новообразования, которая содержит:

(а) BCL-2 ингибитор, выбранный из (i) N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, (ii) 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, и (iii) 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-[(3-нитро-4-{[(оксан-4-ил)метил]амино}фенил)сульфонил]-2-[(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)окси]бензамид (ABT-199); и

(б) MCL1 ингибитор, выбранный из (iv) (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовой кислоты или её соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, и (v) (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовой кислоты или её соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием,

для одновременного, последовательного или раздельного применения.

Некоторые BCL-2 ингибиторы, их синтез, их применение для лечения злокачественного новообразования и их фармацевтические препараты, описаны в WO 2013/110890, WO 2015/011397, WO 2015/011399 и WO 2015/011400, содержание которых включено в качестве ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения BCL-2 ингибитор выбирают из следующих соединений:

4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-[(3-нитро-4-{[(оксан-4-ил)метил]амино}фенил)сульфонил]-2-[(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)окси]бензамид (венетоклакс или ABT-199);

4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-5,5-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-(4-{[(2R)-4-(морфолин-4-ил)-1-(фенилсульфанил)бутан-2-ил]амино}-3-(трифторметансульфонил)бензолсульфонил]бензамид (навитоклакс или ABT-263);

облимерсен (G3139);

обатоклакс (GX15-070);

HA14-1;

(±)-госсипол (BL-193);

(-)-госсипол (AT-101); апогоссипол; TW-37;

антимицин А, ABT-737 (Oltersdorf T и др., Nature 2005 June 2;435(7042):677-81) и

соединения, описанные в WO 2013/110890, WO 2015/011397, WO 2015/011399 и WO 2015/011400, содержание которых включено в качестве ссылки.

Указанные MCL1 ингибиторы, их синтез, их применение для лечения злокачественного новообразования и их фармацевтические препараты, описаны в WO 2015/097123, содержание которой включено в качестве ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения MCL1 ингибитор выбирают из A-1210477 (Cell Death and Disease 20156, e1590; doi:10.1038/cddis.2014.561) и соединений, описанных в WO 2015/097123, WO 2016/207216, WO 2016/207217, WO 2016/207225, WO 2016/207226 или в WO 2016/033486, содержание которых включено в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления, изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую:

(а) Соединение 1: N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид, или его фармацевтически приемлемую соль, и

(б) MCL1 ингибитор, как описано здесь, для одновременного, последовательного или раздельного применения.

В другом варианте осуществления, изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую:

(а) Соединение 4: 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, и

(б) MCL1 ингибитор, как описано здесь, для одновременного, последовательного или раздельного применения.

Альтернативно, изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую:

(а) BCL-2 ингибитор, как описано здесь, и

(б) Соединение 2: (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту для одновременного, последовательного или раздельного применения.

В другом варианте осуществления, изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую:

(а) BCL-2 ингибитор, как описано здесь, и

(б) Соединение 3: (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту, для одновременного, последовательного или раздельного применения.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает применение комбинации, как описано в настоящей заявке, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает лекарственное средство, содержащее, раздельно или совместно,

(а) BCL-2 ингибитор, как описано здесь, и

(б) MCL1 ингибитор, как описано здесь, для одновременного, последовательного или раздельного введения, и где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор обеспечиваются в эффективных количествах для лечения злокачественного новообразования.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение совместно терапевтически эффективного количества:

(а) BCL-2 ингибитора, как описано здесь, и

(б) MCL1 ингибитора, как описано здесь, субъекту, который в этом нуждается.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид гидрохлорид (соединение 1, HCl).

В особенно предпочтительном варианте осуществления BCL-2 ингибитор представляет собой 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид гидрохлорид (соединение 4, HCl).

В другом варианте осуществления BCL-2 ингибитор представляет собой ABT-199.

В другом варианте осуществления MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту (соединение 2).

В другом варианте осуществления MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту (соединение 3).

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Экспрессия BCL-2 и MCL1 преобладает в AML. Образцы 7 AML клеточных линий и 13 первичных AML с >70% бластов подвергали иммуноблоттингу для определения указанных белков, и было показано, что BCL-2 и MCL1 белки доминантно экспрессировались в отличие от BCL-XL, который экспрессировался в меньшем количестве образцов.

Фиг. 2. Комбинированное BCL-2/MCL1 нацеливание имеет синергическую активность в AML in vitro и in vivo. (A) 54 образца первичных AML инкубировали в диапазоне концентраций 6-log Соединения 1 (HCl соль), Соединения 2 или 1:1 концентрации в RPMI/15% FCS в течение 48 ч и определяли LC₅₀ (B) Четырем группам NSG мышей прививали MV4; 11 клетки, экспрессирующие люциферазу. Приживление опухоли верифицировали в день 10 (исходное значение) и затем осуществляли введение соединения 1, HCl 100 мг/сутки перорально в рабочие дни (выраженного в виде свободного основания) или соединения

2 25 мг/кг в/в два раза в неделю в течение 4 недель. О влиянии соединения 2 и комбинации с соединением 1 свидетельствовало уменьшение количества массы люциферазы в дни 14 и 28 после начала терапии и повышение общей выживаемости (С).

Фиг. 3. Определение токсичности комбинированного BCL-2/MCL1 нацеливания на нормальные CD34+ клетки от нормальных доноров или лейкемические бластные клетки. Сортированные нормальные CD34+ или лейкемические бластные клетки высевали и обрабатывали с помощью соединения 1, HCl и соединения 2 при соотношении 1:1 в указанных концентрациях. Комбинация соединения 1 + соединения 2 является токсичной для лейкемических, но не для нормальных CD34+ предшественников.

Фиг. 4. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 в комбинации с соединением 1, HCl в DB клетках (А) и Toledo клетках (В). Значения в матрице влияния находятся в диапазоне от 0 (без ингибирования) до 100 (тотальное ингибирование). Значения в матрице синергизма представляют собой степень ингибирования роста выше теоретической аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств соединения 3 и соединения 1, HCl при тестируемых концентрациях. Синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств.

Фиг. 5. Противоопухолевые эффекты соединения 1, HCl, соединения 3 и комбинации соединения 1, HCl + соединения 3 на модели ксенотрансплантата лимфомы Karpas422 у крыс.

Фиг. 6. Изменения массы тела у животных, леченных с применением соединения 1, HCl, соединения 3 и комбинации соединения 1, HCl + соединения 3 на модели ксенотрансплантата лимфомы Karpas422 у крыс.

Фиг. 7. Противоопухолевые эффекты соединения 1, HCl, соединения 3 и комбинации соединения 1, HCl + соединения 3 на DLBCL Toledo модели ксенотрансплантата у мышей.

Фиг. 8. Изменения массы тела у животных, леченных с применением соединения 1, HCl, соединения 3 и комбинации соединения 1, HCl + соединения 3 на DLBCL Toledo модели ксенотрансплантата у мышей.

Фиг. 9. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в AML клеточной линии OCI-AML3 в двух независимых экспериментах.

Значения в матрице влияния находятся в диапазоне от 0 (без ингибирования) до 100 (тотальное ингибирование). Значения в матрице синергизма представляют собой степень ингибирования роста выше теоретической аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств соединения 3 и соединения 1, HCl при тестируемых концентрациях. Синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств.

Фиг. 10. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в NB клеточной линии LAN-6 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель). Значения в матрице влияния находятся в диапазоне от 0 (без ингибирования) до 100 (тотальное ингибирование). Значения в матрице синергизма представляют собой степень ингибирования роста выше теоретической аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств соединения 3 и соединения 1, HCl при тестируемых концентрациях.

Фиг. 11. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в B-ALL клеточной линии NALM-6 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель).

Фиг. 12. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в MCL клеточной линии Z-138.

Фиг. 13. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с ABT-199 (BCL-2 ингибитор) в AML клеточной линии OCI-AML3 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель).

Фиг. 14. Типичные матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 4, HCl (BCL-2 ингибитор) в AML клеточных линиях (ML-2 клетки в А и OCI-AML-3 в В).

Фиг. 15 (а)-(е). Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в панели SCLC клеточных линий.

Фиг. 16 (а)-(б). Противоопухолевые эффекты соединения 1, HCl, АВТ-199, соединения 3 и комбинации соединения 1, HCl или АВТ-199 + соединения 3 на полученной от пациентов первичной АМЛ модели НАМХ5343 у мышей.

Фиг. 17. Сравнение теплокарты АМЛ чувствительности (LC₅₀) к ВНЗ-миметической монотерапии, или комбинациям лекарственных средств (тестированных при соотношении 1:1), относительно химиотерапии (идарубицин) после воздействия в течение 48 ч. Представлена жизнеспособность клеток каждого образцов первичных АМЛ через 48 ч в ДМСО.

Подробное описание изобретения

Таким образом, изобретение обеспечивает в варианте осуществления Е1, комбинацию для лечения злокачественного новообразования, содержащую:

- (а) BCL-2 ингибитор, выбранный из
 - (i) N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[[((3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил)карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил]-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием,
 - (ii) 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием и
 - (iii) 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-[(3-нитро-4-{[(оксан-4-ил)метил]амино}фенил)сульфонил]-2-[(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)окси]бензамид (АВТ-199);
- и (б) MCL1 ингибитор, выбранный из
 - (iv) (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}-фенил)пропионовой кислоты или её соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, и
 - (v) (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовой кислоты или её соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием для одновременного, последовательного или раздельного применения.

Дополнительные пронумерованные варианты осуществления (Е) изобретения описаны в настоящей заявке. Следует принять во внимание, что характерные особенности, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть комбинированы с другими указанными характерными особенностями, для обеспечения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Е2. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е1, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[[((3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил)карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил]-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамида.

Е3. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е1, где BCL-2 ингибитор представляет собой 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида.

Е4. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е2, где N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[[((3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил)карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил]-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамида представлен в форме гидрохлоридной соли.

Е5. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е3, где 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида представлен в форме гидрохлоридной соли.

Е6. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е1, где BCL-2 ингибитор представляет собой АВТ-199.

Е7. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е1, где MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

Е8. Комбинация в соответствии с вариантом осуществления Е1, где MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

Е9. Комбинация в соответствии с любым вариантом осуществления Е1-Е8, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей.

Е10. Применение комбинации в соответствии с любым вариантом осуществления Е1-Е8, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Е11. Применение в соответствии с вариантом осуществления Е10, где злокачественное новообразование представляет собой лейкоз.

E12. Применение в соответствии с вариантом осуществления E11, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, T-ALL или B-ALL.

E13. Применение в соответствии с вариантом осуществления E10, где злокачественное новообразование представляет собой миелодиспластический синдром или миелопролиферативное заболевание.

E14. Применение в соответствии с вариантом осуществления E10, где злокачественное новообразование представляет собой лимфому.

E15. Применение в соответствии с вариантом осуществления E14, где лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

E16. Применение в соответствии с вариантом осуществления E15, где неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому или лимфому из клеток зоны мантии.

E17. Применение в соответствии с вариантом осуществления E10, где злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

E18. Применение в соответствии с вариантом осуществления E10, где злокачественное новообразование представляет собой нейробластому.

E19. Применение в соответствии с вариантом осуществления E10, где злокачественное новообразование представляет собой мелкоклеточный рак лёгкого.

E20. Лекарственное средство, содержащее, отдельно или совместно,
(а) BCL-2 ингибитор, как определено в варианте осуществления E1, и
(б) MCL1 ингибитор, как определено в варианте осуществления E1,
для одновременного, последовательного или отдельного введения, и где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор обеспечиваются в эффективных количествах для лечения злокачественного новообразования.

E21. Применение терапевтически эффективного количества (а) BCL-2 ингибитора, как определено в варианте осуществления E1, и (б) MCL1 ингибитора, как определено в варианте осуществления E1, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

E22. Применение синергетически эффективного количества (а) BCL-2 ингибитора, как определено в варианте осуществления E1, и (б) MCL1 ингибитора, как определено в варианте осуществления E1, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

E23. Применение в соответствии с вариантом осуществления E22, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор обеспечиваются в синергетически эффективных количествах, которые способны уменьшать дозу, необходимую для каждого соединения для лечения злокачественного новообразования, обеспечивая при этом эффективное лечение злокачественного новообразования, с уменьшением в конечном итоге побочных эффектов.

E24. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолин-ил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид, причем BCL-2 ингибитор при осуществлении комбинированного лечения используется в дозе от 50 до 1500 мг.

E25. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор вводят один раз в неделю.

E26. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолин-ил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид, причем BCL-2 ингибитор при осуществлении комбинированного лечения вводят один раз в сутки.

E27. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор вводят перорально.

E28. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор вводят перорально и MCL1 ингибитор вводят внутривенно.

E29. Применение в соответствии с вариантом осуществления E21, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор вводят внутривенно.

"Комбинация" относится либо к комбинации с фиксированной дозой в одной единичной дозированной форме (например, капсуле, таблетке или саше), комбинации с нефиксированной дозой, или набору для комбинированного введения, где соединение согласно настоящему изобретению и один или несколько компонентов из комбинации (например, другое лекарственное средство, как объясняется ниже, также обозначается в виде "терапевтического средства" или "соагента") могут вводиться независимо в одно и то же время или отдельно в течение временных интервалов, в особенности, если эти временные интервалы предоставляют возможность для компонентов комбинации проявлять совместный, например, синергетический эффект.

Термины "совместное введение" или "комбинированное введение" или тому подобные, как используется в настоящей заявке, охватывают введение выбранного компонента комбинации единичному субъекту, который в этом нуждается (например, пациенту), и включают схемы лечения, при которых агенты не обязательно вводятся одним и тем же путем введения или в одно и то же время.

Термин "комбинация с фиксированной дозой" обозначает, что активные компоненты, например, со-

единение формулы (I) и один или несколько компонентов комбинации, оба вводятся пациенту одновременно в форме единого целого или дозировки.

Термин "комбинация с нефиксированной дозой" обозначает, что активные компоненты, например, соединение согласно настоящему изобретению и один или несколько компонентов комбинации, оба вводятся пациенту в виде отдельных составляющих либо одновременно или последовательно, без специфических временных ограничений, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента.

Последнее также применяется для коктейльной терапии, например, введение трех или более активных компонентов.

"Злокачественное новообразование" обозначает класс заболеваний, в котором группа клеток проявляет неконтролируемый рост. Типы злокачественных новообразований включают гематологическую злокачественную опухоль (лимфома и лейкоз) и солидные опухоли, включая карциному, саркому или бластому. В особенности "злокачественное новообразование" относится к лейкозу, лимфоме или множественной миеломе, и более специфически к острому миелоидному лейкозу.

Термин "совместно терапевтически эффективны" обозначает, что терапевтические средства могут вводиться отдельно (в хронологически установленном порядке, в особенности специфически к последовательности образом) в такие временные интервалы, что они могут предпочтительно, у теплокровного животного, в особенности у человека, лечить, все еще проявляя (предпочтительно синергетическое) взаимодействие (совместный терапевтический эффект). В любом случае, это может быть установлено, в частности, путем определения последующих уровней в крови, свидетельствующих о том, что оба соединения присутствуют в крови человека, подвергаемого лечению, по меньшей мере на протяжении определенных временных интервалов.

"Синергетически эффективны" или "синергизм" обозначает, что терапевтический эффект, наблюдаемые после введения двух или более агентов является больше, чем сумма терапевтических эффектов, наблюдаемых после введения каждого единичного средства.

Как используется в настоящей заявке, термин "лечить", "лечение" или "терапия" любого заболевания или нарушения относится в одном варианте осуществления, к ослаблению заболевания или нарушения (то есть, облучение или остановка или уменьшение развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "лечение" или "терапия" относится к ослаблению или облегчению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут не ощущаться пациентом. В еще другом варианте осуществления "лечить", "лечение" или "терапия" относится к модуляции заболевания или нарушения, либо физически, (например, стабилизация различимого симптома), физиологически, (например, стабилизация физического параметра), или обоих.

Как используется в настоящей заявке, субъект "нуждается в" лечении, если такой субъект будет получать преимущества биологически, медицински или качества жизни от такого лечения.

В другом аспекте, обеспечивается способ сенсibilизации человека, который является (I) рефракторным к по меньшей мере одному химиотерапевтическому лечению, или (II) имеет рецидив после лечения с применением химиотерапии или в обоих случаях (I) и (II), где способ включает введение BCL-2 ингибитора в комбинации с MCL1 ингибитором, как описано в настоящей заявке, пациенту. Пациент, который сенсibilизируется, представляет собой пациента, который отвечает на лечение, включающее введение BCL-2 ингибитора в комбинации с MCL1 ингибитором, как описано в настоящей заявке, или у которого не развилась резистентность к такому лечению.

"Лекарственное средство" обозначает фармацевтическую композицию, или комбинацию нескольких фармацевтических композиций, которая содержит одно или несколько активных компонентов в присутствии одного или нескольких наполнителей.

"AML" обозначает острый миелоидный лейкоз.

"T-ALL" и "B-ALL" обозначает Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз.

"Свободное основание" относится к соединению, когда оно не представлено в форме соли.

В фармацевтических композициях в соответствии с изобретением, пропорция активных компонентов по весу (вес активных компонентов по отношению к общему весу композиции) составляет 5-50%.

В качестве фармацевтических композиций в соответствии с изобретением более специфически используют те, которые являются подходящими для введения пероральным, парентеральным и в особенности внутривенным, через- или транскожным, назальным, ректальным, подязычным, глазным или респираторным путем, более специфически таблетки, драже, подязычные таблетки, твердые желатиновые капсулы, таблетки для медленного растворения под языком, капсулы, пастилки, инъекционные препараты, аэрозоли, глазные капли или капли в нос, суппозитории, кремы, мази, кожные гели и др.

Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут содержать один или несколько наполнителей или носителей, выбранных из разбавителей, смазывающих веществ, связующих, дезинтеграторов, стабилизаторов, консервантов, абсорбентов, красителей, подсластителей, ароматизаторов и др.

В качестве неограничивающего примера можно указать
 в качестве разбавителей лактоза, декстроза, сахароза, маннит, сорбит, целлюлоза, глицерин,
 в качестве смазывающих веществ диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и её магниевая и кальциевая соли, полиэтиленгликоль,

в качестве связующих алюмосиликат магния, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и поливинилпирролидон,

в качестве дезинтеграторов агар, альгиновая кислота и её натриевая соль, шипучие смеси.

Соединения комбинации могут вводиться одновременно или последовательно. Путь введения предпочтительно представляет собой пероральный путь, и соответствующие фармацевтические композиции могут предоставлять возможность немедленного или отсроченного высвобождения активных компонентов. Соединения комбинации, кроме того, могут вводиться в форме двух отдельных фармацевтических композиций, каждая из которых содержит один из активных компонентов, или в форме единственной фармацевтической композиции, в которой активные компоненты представлены в смеси. Предпочтительными являются фармацевтические композиции, представляющие собой таблетки.

Фармацевтическая композиция соединения 1 HCl соли, представляющая собой покрытую пленочной оболочкой таблетку, содержащую 50 и 100 мг лекарственного вещества

	Количество (мг)		Функция
	50 мг дозировка	100 мг дозировка	
Таблетка			
Соединение 1 HCl соль	52,58	105,16	Лекарственное вещество
Эквивалентно в пересчёте на основание	50	100	
Лактоза моногидрат	178,51	357,02	Разбавитель
Кукурузный крахмал	66,6	133,2	Дезинтегрант
Повидон	23,31	46,62	Связующее
Стеарат магния	3,33	6,66	Смазывающее вещество
Диоксид кремния, коллоидный безводный	0,67	1,34	Агент, обеспечивающий текучесть
Натрия крахмала гликолят (Тип А)	10	20	Дезинтегрант
Для таблетки без оболочки с массой	335	670	
Пленочная оболочка			
Глицерин	0,507	1,014	Материал для придания пластичности
гипромеллоза	8,419	16,838	Плёнкообразователь
Макрогол 6000	0,538	1,076	Компонент, способствующий разглаживанию
Стеарат магния	0,507	1,014	Смазывающее вещество
Диоксид титана	1,621	3,242	Пигмент
Переходные наполнители			
Вода, очищенная	qs.	qs.	Разбавитель
Для таблетки, покрытой пленочной оболочкой, с массой	346,6	693,2	

Фармакологические данные

Материалы и методы для примеров 1-3

Образцы первичных AML от пациентов:

Образцы костного мозга или периферической крови от пациентов с AML собирали после получения информированного согласия согласно требованиям, утвержденным исследовательским комитетом по этическим вопросам Alfred Hospital Human. Мононуклеарные клетки выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque (GE Healthcare, VIC, Aus), с последующим истощением эритроцитов в лизирующем буфере хлориде аммония (NH₄Cl) при 37°C в течение 10 мин. Затем клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 2% фетальную бычью сыворотку (Sigma, NSW, Aus). После этого мононуклеарные клетки суспендировали в RPMI-1640 (GIBCO VIC, Aus) среде, содержащей пенициллин и стрептомицин (GIBCO) и инактивированную нагреванием фетальную бычью сыворотку 15% (Sigma).

Клеточные линии, клеточные культуры и создание люциферазных репортерных клеточных линий:

Клеточные линии MV4; 11, OCI-AML3, HL-60, HEL, K562, KG-1 и EOL-1 поддерживали при 37°C, 5% CO₂ в RPMI-1640 (GIBCO), дополненной 10% (об./об.) фетальной бычьей сывороткой (Sigma) и пенициллином и стрептомицином (GIBCO). MV4; 11 люциферазные клеточные линии создавали с помощью лентивирусной трансдукции.

Антитела: Первичные антитела, используемые для вестерн-блоттинга, представляли собой MCL1, BCL-2, Вах, Bak, Bim, BCL-XL (созданные на собственной базе WEHI) и тубулин (T-9026, Sigma).

Жизнеспособность клеток: Только что очищенные моноклеарные клетки из образцов AML пациентов доводили до концентрации $2,5 \times 10^5$ /мл и вносили 100 мкл аликвот клеток на лунку в планшеты на 96 лунок (Sigma). После этого клетки обрабатывали с помощью соединения 1, HCl, соединения 2, ABT-199 (Active Biochem, NJ, USA) или идарубицина (Sigma), в диапазоне 6-лог концентраций от 1 нМ до 10 мкМ в течение 48 ч. Для исследования комбинаций, лекарственные средства добавляли в соотношении 1:1 от 1 нМ до 10 мкМ и инкубировали при 37°C 5% CO₂. После этого клетки окрашивали с помощью *sytox* синего полинуклеотидного красителя (Invitrogen, VIC, Aus) и измеряли флуоресценцию с помощью проточного цитометрического анализа, используя LSR-II Fortessa (Becton Dickinson, NSW, Aus). FACSDiva программное обеспечение использовали для сбора данных, и FlowJo программное обеспечение для анализа. Бластные клетки регулировали, используя свойства прямого и бокового светорассеяния. Жизнеспособные клетки, исключая *sytox* синий, определяли при 6 концентрациях для каждого лекарственного средства и определяли 50% летальную концентрацию (LC₅₀, в цМ).

Определение LC₅₀ и синергизма:

Graphpad Prism использовали для расчета LC₅₀, используя нелинейную регрессию. Синергизм определяли путем индекса аддитивности (ИА на основании метода Chou Talalay, как описано (Chou Cancer Res; 70(2) January 15, 2010).

Исследования колоний:

Колониеобразующие исследования осуществляли на свежеприготовленных и замороженных моноклеарных фракциях от AML пациентов. Первичные клетки культивировали в двух повторах в чашках 35 мм (Griener-bio, Germany) при концентрациях от 1×10^4 до 1×10^5 . Клетки высевали в 0,6% агар (Difco NSW, Aus): AIMDM 2× (IMDM powder-Invitrogen), дополненный NaHCO₃, декстраном, Пен/Стрепт, В меркаптоэтанолом и аспарагином): Фетальная бычья сыворотка (Sigma) при соотношении 2:1:1. Для оптимальных условий роста все планшеты, содержащие GM-CSF (100 нг на планшет), IL-3 (100 нг/планшет R&D Systems, USA) SCF (100 нг/планшет R&D Systems) и EPO (4 Ед/планшет) (Рост происходил в течение 2-3 недель в присутствии и отсутствии лекарственного средства при 37°C при 5% CO₂ в инкубаторе с повышенной влажностью. После инкубирования планшеты фиксировали с помощью 2,5% глутаральдегид в солевом растворе и оценивали, используя GelCount от Oxford Optronix (Abingdon, United Kingdom).

Вестерн-блоттинг:

Лизаты приготавливали в NP40 лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 10% глицерин, 1% NP40), дополненном коктейлем ингибитора протеазы (Roche, Dee Why, NSW, Australia). Белковые образцы кипятили при уменьшенной нагрузке красителя перед разделением на 4-12% Бис-Трис полиакриламидных гелях (Invitrogen, Mulgrave, VIC, Australia), и переносили на Hybond C нитроцеллюлозную мембрану (GE, Rydalmere, NSW, Australia) для инкубирования со специфическими антителами. Все стадии блокирования мембран и разведения антител осуществляли, используя 5% (об./об.) обезжиренного молока в PBS, содержащем 0,1% (об./об.) Твин-20 фосфатно-солевого буферного раствора (PBST) или ТРИС-буферизированный физраствор, и стадии промывки осуществляли с PBST или TBST. Вестерн-блоттинги визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (GE).

Эксперименты *in vivo* прививания AML: Исследования на животных осуществляли согласно правилам, утвержденным Alfred Medical Research and Education Precinct Animal Ethics Committee, MV4; 11 клетки, трансдуцированные с репортером люциферазы (pLUC2), внутривенно инъецировали в количестве 1×10^5 клеток в облученные (100 рад) не страдающим ожирением диабетическим/тяжелым комбинированным иммунодефицитным (NOD/SCID/ IL2rynull) мышам, как было описано ранее (Jin и др., Cell Stem Cell 2 июля 2009 г., том 5, издание 1, стр. 31-42). Прижившие клетки измеряли в день 7 путем количественного определения hCD45+ клеток в PB с помощью проточной цитометрии и с помощью IVIS визуализации биolumинесценции MV4; 11 клеток. В день 10 мыши получали ежедневно перорально принудительное кормление Соединением 1, HCl (200 мкл 100 мг/кг - дозировка, выраженная в виде свободного основания), растворенным в PEG400 (Sigma), абсолютном этаноле (Sigma) и дистиллированной H₂O 40:10:60 или Соединением 2 (200 мкл 25мг/кг) два раза в неделю, растворенным в 50% 2-гидроксипропил-β-циклодекстрине (Sigma) и 50% 50 mM HCl или комбинацией лекарственных средств или наполнителя, в течение 4 недель. Подсчеты импульсов в крови осуществляли, используя гематологический анализатор (BioRad, Gladesville, NSW).

IVIS визуализация: Биolumинесцентную визуализацию осуществляли, используя систему визуализации Caliper IVIS Lumina III XR. Мышей анестезировали изофлеурином и внутрибрюшинно инъецировали 100 мкл 125 мг/кг люциферина (Perkin Elmer, Springvale, VIC).

Материалы и методы для примера 4

Клеточные линии: Клеточные линии миеломы человека (HMCL) имели происхождение из первичных миеломных клеток, культивированных в RPMI 1640 среде, дополненной 5% фетальной телячьей сывороткой от и 3 нг/мл рекомбинантного IL-6 для IL-6 зависимых клеточных линий. HMCL были репрезентативными для фенотипической и геномной гетерогенности и изменчивости ответной реакции пациента на терапию.

МТТ исследование:

Жизнеспособность клеток измеряли, используя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) колориметрический анализ выживания. Клетки инкубировали с соединениями в планшетах на 96 лунок, содержащих конечный объем 100 мкл/лунку во времени. (2R)-2-[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксифенил]-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту (соединение 2) использовали в 9 различных концентрациях в соответствии с чувствительностью к одному средству. N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинилкарбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид гидрохлорид (соединение 1, HCl) использовали в фиксированной дозе - 1 мкМ. После окончания каждого лечения, клетки инкубировали с 1 мг/мл МТТ (50 мкл МТТ раствора 2,5 мг/мл для каждой лунки) при 37°C в течение 3 ч, предоставляя возможность метаболизироваться МТТ. В каждую лунку добавляли лизирующий буфер (100 мкл Лизирующий буфер: ДМФА (2:3)/SDS (1:3)) для растворения кристаллов формазана и после инкубирования в течение 18 ч измеряли абсорбцию жизнеспособных клеток при 570 нм, используя спектрофотометр. В качестве контроля клетки инкубировали только со средой и со средой, содержащей 0,1% ДМСО. В качестве контроля роста миеломных клеток абсорбцию миеломных клеток записывали каждый день (D0, D1, D2, D3 и D4). Все эксперименты повторяли 3 раза, и каждое экспериментальное условие повторяли по меньшей мере в лунках в трех повторах в каждом эксперименте.

Ингибирующий эффект рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

Ингибирующий эффект (%) = (1-Значение абсорбции леченных клеток/Значение абсорбции контрольных клеток)×100

Пример 1. BCL-2 и MCL1 представляют собой доминантные способствующие выживанию белки, экспрессируемые в AML

Образцы 7 AML клеточных линий и 13 первичных AML с >70% бластами подвергали иммуноблоттингу для определения белков, как указано на фиг. 1. Как проиллюстрировано на фиг. 1, протеомный обзор экспрессии представителей семейства BCL-2 в AML свидетельствует о том, что дополнительно к BCL-2, большинство образцов первичных AML и AML клеточных линий совместно экспрессирует способствующий выживанию белок MCL1. BCL-XL менее часто экспрессируется в AML.

Пример 2. Комбинированное BCL-2 и MCL1 нацеливание проявляет синергетическое уничтожение в AML

54 Образца AML от пациентов инкубировали в диапазоне концентраций 6-лог Соединения 1 (HCl соль), Соединения 2 или 1:1 концентрация в RPMI/15% FCS в течение 48 ч и определяли LC₅₀ (фиг. 2A).

Приблизительно 20% образцов первичных AML были чрезвычайно чувствительны либо к Соединению 1 или Соединению 2, с летальной концентрацией лекарственного средства, необходимой для уничтожения 50% первичных AML бластов через 48 ч (LC₅₀) в нижнем наномолярном диапазоне (LC₅₀<10 нМ) (фиг. 2A). В отличие от этого, если комбинировали Соединение 1 и Соединение 2, то пропорция образцов AML, которые были чувствительны, существенно повышалась до 70%, указывая на синергетическую активность при одновременном нацеливании BCL-2 и MCL1 (фиг. 2A). Некоторые результаты представлены на фиг. 17.

Для верификации активности этого подхода *in vivo*, MV4; 11 AML клетки, экспрессирующие люциферазу, прививали NSG мышам и лечили с помощью соединения 1 (HCl соль) или соединения 2 отдельно, или в комбинации и опухолевую нагрузку оценивали через 14 и 21 дней терапии (фиг. 2B). После завершения 28 дней терапии за мышами наблюдали для определения выживания (фиг. 2C). Эти эксперименты указывают на то, что комбинация Соединения 1 и Соединения 2 является высокоэффективной *in vivo*, подтверждая чрезвычайно хорошую активность, наблюдаемую при использовании первичных AML клеток *in vitro*.

Данные, представленные на фиг. 2A-2C в настоящей заявке, свидетельствуют о синергетической активности комбинации между соединением 1, HCl и соединением 2 на AML.

Пример 3. Комбинированное BCL-2 и MCL1 ингибирование нацеливание функцию лейкемических предшественников, но не функцию нормальных предшественников

Для оценки токсичности ингибирования BCL-2 в комбинации с ингибированием MCL1 на функцию нормальных CD34⁺ клеток человека или фиколированных бластных клеток от пациентов с AML клонотипический потенциал оценивали после воздействия в течение 2 недель для комбинированных терапий. Колонии выращивали на агаре, дополненном 10% FCS, IL3, SCF, GM-CSF и EPO в течение 14 дней, и колонии подсчитывали с помощью автоматизированного Gelcount® анализатора. Исследования для образцов

первичных AML осуществляли в двух повторах и усредняли. Погрешности для CD34+ представляют собой среднее значение $\pm$ СП 2 независимых нормальных донорских образцов. Результаты нормировали к числу колоний, подсчитанных в ДМСО контроле. Указанные концентрации лекарственных средств помещали в планшет в D1. Следует отметить, что Соединение 1 + Соединение 2 подавляет колониюобразующую активность AML без влияния на функции роста колоний нормальных CD34+.

В совокупности, примеры 2 и 3 свидетельствуют о том, что двойственное фармакологическое ингибирование BCL-2 и MCL1 представляет собой новый подход для лечения AML без необходимости дополнительной химиотерапии и с приемлемым терапевтическим окном безопасности.

Пример 4. Оценка *in vitro* выживания клеток множественной миеломы в ответ на действие MCL1 ингибитора в качестве единственного средства или в комбинации с BCL-2 ингибитором

Анализировали чувствительность 27 клеточных линий множественной миеломы человека к соединению 1, соединению 2 или к соединению 2 в присутствии 1 мкМ соединения 1 путем применения МТТ исследования жизнеспособности клеток. Определяли 50% ингибирующие концентрации (IC_{50} , в нМ).

Результаты представлены в следующей таблице:

Клеточные линии	Соединение 1, HCl (IC_{50} нМ)	Соединение 2 (IC_{50} нМ)	IC_{50} Соединения 2 в присутствии 1 мкМ Соединения 1, HCl (нМ)
AMO1	8610,3	0,5	0,2
ANBL6	1905,0	79,5	20,8
BCN	22217,0	1111,4	59,3
JIM3	>30000	56,3	25,9
JJN3	2692,0	15,6	2,4
KMM1	23926,3	57,8	8,6
KMS11	10486,7	44,1	3,9
KMS12BM	1393,7	44,1	0,03
L363	7581,3	7,6	3,4
LP1	9770,0	158,2	2,9
MM1S	21407,0	138,5	23,0
NAN1	6659,0	5,7	1,4
NAN3	8241,3	1,5	1,2
NAN6	4074,8	7,1	1,8
NAN8	9096,3	75,4	32,5
NAN9	23157,6	9,7	1,1
NCI-H929	15688,3	2,3	1,0
OPM2	6460,7	9,4	1,2
RPMI8226	3204,0	27,4	3,0
SBN	21273,7	221,1	14,6
U266	>30000	170,1	14,9
XG1	9779,7	5,9	0,2
XG11	7912,0	374,7	8,3
XG2	15297,7	6,4	2,7
XG3	7224,7	6,1	1,3
XG6	8544,3	19,2	0,5
XG7	18121,7	16,3	8,0

Сильная синергетическая активность была показана при комбинировании соединения 1 и соединения 2 в большинстве клеточных линий по сравнению с соединениями отдельно.

Пример 5. Влияние *in vitro* на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 17 клеточных линий диффузная крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL)

Материалы и методы

Клеточные линии получали из источников и поддерживали в основной среде, дополненной FCS (Фетальная телячья сыворотка), как указано в табл. 1.

Дополнительно, все среды содержали пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ). Если специально не указано иначе, то культуральные среды и добавки получали от Amimed/Bioconcept (Allschwil, Switzerland).

Клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ и поддерживали в T-75 колбах. Во всех случаях, клетки размораживали из замороженных маточных растворов, проводили через ≥ 1 пассаж, используя подходящие разведения, подсчет и оценку жизнеспособности, используя CASY устройство для подсчета клеток (Omni Life Science, Bremen, Germany) перед высеванием по 25 мкл/луночку при плотностях, указанных в табл. 1 в планшеты на 384 лунок (Corning). Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматических загрязнений с помощью ПЦР ана-

лиза, осуществленного на Idexx Raddi (Columbia, MO, USA) и исключение ошибочной идентификации проводили с помощью панели 48 полиморфизма небольших нуклеотидов (SNP) в Asuragen (Austin, TX, USA) или самостоятельно.

Маточные растворы соединений приготавливали при концентрации 10 мМ в ДМСО (Sigma) и хранили при -20°C. При необходимости, для получения полной кривой зависимости "доза-эффект", маточные растворы предварительно разводили в ДМСО до 1000-кратной желательной начальной концентрации (см. табл. 2). На следующий день после высевания клеток, восемь 2,5-кратных серийных разведений каждого соединения отмеряли, либо индивидуально или во всех возможных перестановках в шахматном порядке, непосредственно в планшеты для клеточных анализов, используя бесконтактный цифровой диспенсер 300D Digital Dispenser (TECAN, Mannedorf, Switzerland), как представлено на фиг. 4. Конечная концентрация ДМСО составляла 0,2% во всех лунках.

Влияния единичных агентов, а также их комбинаций в шахматном порядке на жизнеспособность клеток оценивали после инкубирования в течение 2 дней при 37°C/5% CO₂ путем количественного анализа клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo (Promega, Madison, WI, USA) при 25 мкл реагента/лунку и n=2 повторах планшет на условие. Люминесценцию количественно измеряли на многофункциональном планшет-ридере M1000 (TECAN, Mannedorf, Switzerland). Количество/жизнеспособность клеток во время добавления соединения также оценивали и использовали для оценки порядка времени удвоения популяции конкретной клеточной линии.

IC₅₀ для отдельных агентов рассчитывали, используя подгонку кривых по четырем параметрам. Потенциальные синергические взаимодействия между комбинациями соединений оценивали, используя 2D матрицу избыточного ингибирования в соответствии с моделью аддитивности Loewe и описывали в виде Оценки Синергизма (Synergy Score) (Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666). Все расчеты осуществляли с использованием модуля анализа комбинаций с собственным программным обеспечением. IC₅₀ определяли в виде концентрации соединения, при которой CTG сигнал уменьшается на 50% относительно такого сигнала, измеренного для контрольного наполнителя (ДМСО).

Интерпретацию оценки синергизма (Synergy Score) осуществляли следующим образом:

SS~0→Аддитивный

SS>1→Слабый синергизм

SS>2→Синергизм

Таблица 1. Идентичность и условия исследований для 17 клеточных линий диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, используемых в комбинированных экспериментах

Клеточная линия	Среда (источник)	%FCS	Время удвоения (часы)	Количество высеванных клеток/лунку
DB	RPMI (ATCC)	10	31,7	500
DOHH-2	RPMI (DSMZ)	10	25,3	500
HT	RPMI (ATCC)	10	34,3	2000
JM1	MEM Искова*(ATCC)	10	22,8	500
KARPAS-422	RPMI (DSMZ)	10	26,5	500
NU-DHL-1	RPMI (DSMZ)	20	28,0	500
OCI-LY-19	MEM альфа (DSMZ)	20	25,8	500
Pfeiffer	RPMI (ATCC)	10	46,2	2000
RL	RPMI (ATCC)	10	28,9	500
SU-DHL-10	RPMI (DSMZ)	20	105,7	1000
SU-DHL-4	RPMI (DSMZ)	10	25,2	500
SU-DHL-5	RPMI (DSMZ)	20	25,9	500
SU-DHL-6	RPMI (DSMZ)	20	30,1	500
SU-DHL-8	RPMI (DSMZ)	20	23,6	500
Toledo	RPMI (ATCC)	10	49,6	2000
U-937	RPMI (ATCC)	10	28,7	500
WSU-DLCL2	RPMI (DSMZ)	10	26,1	500

*Эта среда была дополнительно дополнена 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом.

Время удвоения рассчитывали на основании различия уровней АТФ после окончания эксперимента по сравнению с началом инкубации с соединением.

Таблица 2. Представлены IC₅₀ значения единственных агентов для соединения 3 и соединения 1, HCl, а также оценки синергизма для их комбинации. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$.

Клеточная линия	Соединение 3			Соединение 1, HCl			Комбинация	
	Нач. конц. [мкМ]	Абс IC ₅₀ [мкМ]	Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Абс IC ₅₀ [мкМ]	Макс Инг [%]	Оценка синергизма	Погрешность оценки синергизма
DB	1	0,0129	99,2	10	2,76	95,7	17,3	0,18
DOHH-2	0,1	0,00122	98,3	10	0,156	101,9	2,90	0,11
HT	1	0,00638	99,3	10	≥ 10	37,2	2,35	0,06
JM1	1	0,0588	99,7	10	0,697	99,1	5,83	0,25
KARPAS-422	1	0,00214	98,3	10	2,18	90,9	9,74	0,32
NU-DHL-1	1	0,0579	98,1	10	0,0515	102,1	4,97	0,12
OCI-LY-19	1	0,0604	98,5	10	0,0895	100,1	3,92	0,07
Pfeiffer	1	0,0426	82,7	10	4,50	92,0	3,44	0,19
RL	10	3,03	95,4	10	0,281	99,0	12,7	0,38
SU-DHL-10	1	0,00384	98,3	10	≥ 10	43,9	2,44	0,26
SU-DHL-4	1	0,0178	99,5	10	0,86	96,9	10,8	0,28
SU-DHL-5	0,1	0,00094	98,2	10	≥ 10	49,6	1,45	0,14
SU-DHL-6	1	0,00213	99,1	10	0,614	101,0	4,57	0,21
SU-DHL-8	10	0,305	95,6	10	≥ 10	28,7	9,88	0,20
Toledo	1	≥ 1	45,8	10	0,137	101,9	11,1	0,51
U-937	1	0,00832	97,1	10	6,83	62,1	5,63	0,20
WSU-DLCL2	1	0,00792	99,0	10	1,02	99,3	8,67	0,13

"Нач. конц." обозначает начальную концентрацию.

"Абс IC₅₀" обозначает абсолютную IC₅₀

"Макс Инг" обозначает максимальное ингибирование.

Результаты

Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора соединения 3 с BCL-2 ингибитором соединением 1, HCl оценивали на панели 17 клеточных линий диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). Соединение 3 в качестве единственного средства сильно ингибировало рост большинства 17 DLBCL тестируемых линий (табл. 1). Таким образом, 14 клеточных линий проявляли значения IC₅₀ ниже 100 нМ, и дополнительная 1 клеточная линия проявляла значения IC₅₀ в диапазоне от 100 нМ и до мкМ. Только 2 клеточные линии проявляли IC₅₀ выше 1 мкМ.

Соединение 1, HCl в качестве единственного средства также ингибировало рост большинства 17 DLBCL тестируемых линий, хотя немного менее эффективно (табл. 2). Таким образом, 2 клеточные линии проявляли значения IC₅₀ ниже 100 нМ, и 6 клеточные линии проявляли значения IC₅₀ между 100 нМ и 1 мкМ. Девять клеточных линий проявляли IC₅₀ выше 1 мкМ (четыре из которых выше 10 мкМ).

В комбинации, лечение с применением соединения 3 и соединения 1, HCl вызывает синергическое ингибирование роста (то есть, Оценка синергизма выше 2 - Lehar и др., Nat Biotechnol. Июль 2009 г.; 27(7): 659-666) в 16 из 17 DLBCL тестируемых клеточных линий (табл. 2). В 5 клеточных линиях заметный синергетический эффект, с оценками синергизма между 5 и 10. В 4 клеточных линиях синергетический эффект является экстраординарным, достигая оценок синергизма между 10 и 17,3. Чрезвычайно важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента, и в действительности, является особенно сильным при концентрациях соединения 3 и соединения 1, которые не проявляют антипролиферативный эффект самостоятельно. Например, в DB клетках соединение 3 и соединение 1 при второй тестируемой наиболее низкой концентрации проявляет ингибирование роста только на 1 и 2% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 96% (фиг. 4А, левая панель), таким образом, являясь на 91% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 4А, правая панель). В качестве дополнительно примера, на Toledo клетках, в которых соединение 3 является менее эффективным и обеспечивает только частичное ингибирование роста (46%) при наиболее высокой тестируемой концентрации, комбинация со второй наиболее низкой концентрацией соединения 1 приводит к синергетическому ингибированию роста на 98% (фиг. 4В, левая панель), таким образом, являясь на 52% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 4В, правая панель).

Кроме того, следует отметить, что синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств, которые должны оказаться полезными *in vivo* по отношению к гибкости касательно уровней и схем дозирования.

В заключение, комбинация соединения 3 и соединения 1 обеспечивает от сильного до экстраординарного синергетического ингибирования роста в большинстве тестируемых DLBCL клеточных линий.

Пример 6. Эффективность *in vivo* на Karpas422 ксенотрансплантатах при применении комбинации MCL1 ингибитора (соединение 3) и BCL-2 ингибитора (соединение 1)

Материалы и методы

Культура опухолевых клеток и инокуляция клеток

Клеточную линию Karpas 422 В-клеточной неходжкинской лимфомы человека (NHL) получали из плеврального экссудата пациента с резистентным к химиотерапии NHL. Клетки получали из DSMZ клеточного банка и культивировали в RPMI-1640 среде (BioConcept Ltd. Amimed,) дополненной 10% FCS (BioConcept Ltd. Amimed), 2 mM L-глутамином (BioConcept Ltd. Amimed), 1 mM пируватом натрия (BioConcept Ltd. Amimed) и 10 mM HEPES (Gibco) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на воздухе. Клетки поддерживали в диапазоне 0,5 и 1,5×10⁶ клеток/мл. Для установления Karpas 422 ксенотрансплантатов, клетки собирали и ресуспендировали в HBSS (Gibco) и смешивали с матригелем (BD Bioscience) (1:1 об./об.) перед инъектированием 200 мкл содержащих 1×10⁷ клеток подкожно в правую лапу животных, которые были анестезированы изофлураном. За 24 ч до инокуляции клеток всех животных облучали 5 Гр в течение 2 мин, используя γ-излучатель.

Рост опухоли

За ростом опухоли наблюдали регулярно после инокуляции клеток и животных рандомизировали на леченные группы (n=5), когда размер опухоли достигал подходящего объема. Во время периода лечения, объем опухоли измеряли приблизительно два раза в неделю, используя штангенциркули. Размер опухоли, в мм³, рассчитывали на основании формулы: (L×W²×π/6). Где W = ширина и L = длина опухоли.

Лечение

Животных, несущих опухоль (крысы), разделяли на леченные группы (n=5), когда их опухоли достигали подходящего размера с образованием группы со средним объемом опухоли приблизительно 450 мм³. Леченные группы представлены в табл. 3. Наполнитель для соединения 1, HCl или соединение 1, HCl вводили путем перорального (по) принудительного введения за 1 ч перед наполнителем для соединения 3 или соединением 3, которое вводили путем 15 минутной вв инфузии. Для вв инфузии животных анестезировали с помощью изофлурана/O₂ и наполнитель или соединение 3 вводили через канюлю в хвостовую вену. Животных взвешивали в день (и) дозирования и дозу корректировали на массу тела, дозированный объем составил 10 мл/кг для обоих соединений.

Масса тела

Животных взвешивали по меньшей мере 2 раза в неделю и исследовали более часто при проявлении признаков каких-либо побочных эффектов.

Анализ данных и статистическая оценка

Опухолевые данные анализировали статистически, используя GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software). Если варианты в данных нормально распределены, то данные анализировали с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием Даннетта для сравнения лечения относительно контрольной группы.

Тест Тьюки с апостериорным критерием использовали для межгрупповых сравнений. В других случаях, использовали критерий Крускала-Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Если это является применимым, то данные представляли в виде среднего значения ± СПС.

В качестве критерия эффективности, рассчитывали значение %T/C (лечение/контроль) после окончания эксперимента в соответствии с

$$(\Delta \text{объема опухоли}^{\text{леченные}} / \Delta \text{объема опухоли}^{\text{контроль}}) * 100$$

Регрессию опухоли рассчитывали в соответствии с

$$-(\Delta \text{объема опухоли}^{\text{леченные}} / \text{объем опухоли}^{\text{леченные в начале лечения}}) * 100$$

где Δ объема опухоли представляет собой среднее значение объема опухоли в день оценки минус среднее значение объема опухоли в начале эксперимента.

Таблица 3. Леченные группы для определения эффективности комбинаций на крысах, несущих Karpas422 ксенотрансплантат

Группы	Лечение	Доза (выраженная в виде свободного основания)	Схема	Количество крыс
1	Наполнитель для Соединения 1, HCl (PEG400/EtOH/Phosal 50 PG (30/10/60)), <i>по</i> за 1 ч до наполнителя для Соединения 3, 15 минут <i>вв</i> инфузия 10 мл/кг	10 мл/кг + 10 мл/кг	РН, <i>по</i> за 1 ч до + РН, <i>вв</i> инфузия	5
2	Наполнитель для Соединения 1, HCl + Соединение 3	0 мг/кг + 20 мг/кг	РН, <i>по</i> за 1 ч до + РН, <i>вв</i> инфузия	5
3	Соединение 1, HCl + Наполнитель для Соединения 3	150 мг/кг + 0 мг/кг	РН, <i>по</i> за 1 ч до + РН, <i>вв</i> инфузия	5
4	Соединение 1, HCl + Соединение 3	150 мг/кг + 20 мг/кг	РН, <i>по</i> за 1 ч до + РН, <i>вв</i> инфузия	5

Лечение начинали, когда средний объем опухоли составлял приблизительно 450 мм³. Соединение 1, HCl приготавливали в PEG400/EtOH/Phosal 50 PG (30/10/60) и соединение 3 помещали в раствор. РН обозначает один раз в неделю.

Результаты

Лечение с помощью комбинации свободного основания соединения 1 в дозе 150 мг/кг *по* за 1 ч до соединения 3 в дозе 20 мг/кг *вв* инфузии индуцирует полную регрессию во всех Karpas422 опухолях на 30 от начала лечения (фиг. 5). Все животные в леченной группе имели ремиссию без опухоли после лечения, которая останавливалась в развитии с дня 35 вплоть до дня 90. Положительный эффект комбинации наблюдался в группе с комбинацией по сравнению с активным одного агента. В день 34 опухолевый ответ в группе с одним агентом соединением 3 и группе с комбинацией существенно отличались от группы с наполнителем ($p < 0,05$). Лечение с использованием комбинации хорошо переносилось на основании изменения массы тела (фиг. 6).

Пример 7. Эффективность *in vivo* на DLBCL Toledo ксенотрансплантате с применением комбинации MCL1 ингибитора (соединение 3) и BCL-2 ингибитора (соединение 1, HCl)

Материалы и методы

Имплантация клеток

Модель ксенотрансплантата устанавливали путем прямой подкожной (пк) имплантации 3 миллион-ов суспензии клеток Toledo с 50% матригеля в подкожную область SCID/мышам с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров. Все процедуры осуществляли с использованием асептических техник. Мышей анестезировали на весь период осуществления процедуры. В целом, всего 6 животных на группу включали в исследование эффективности. Для исследования действий одного агента и комбинации животным вводили дозы путем перорального принудительного введения через зонд (*по*) для соединения 1 и внутривенно (*вв*) через хвостовую вену для соединения 3. Соединение 1, HCl приготавливали в виде раствора в PEG300/EtOH/воде (40/10/50), и соединение 3 помещали в раствор. Когда опухоли достигали приблизительно 220 мм в день 26 после имплантации клеток, мышей, несущих опухоли, рандомизировали в леченные группы.

Схема исследования, включая схему дозирования, для всех леченных групп, обобщена в табл. ниже. Животных взвешивали в день (дни) дозирования и дозу корректировали на массу тела, дозированный объем составил 10 мл/кг. Размеры опухоли и массы тела собирали во время рандомизации и два раза в неделю после этого во время осуществления исследования. После каждого дня сбора данных получали следующие данные: частота смертности, индивидуальные и групповые средние значения массы тела и индивидуальные и групповые средние значения объема опухоли.

Группы	Лечение	Доза (выраженная в виде свободного основания)	Схема	Количество мышей
1	Наполнитель	PEG300/EtOH/вода (40/10/50)	РН, <i>по</i>	6
2	Соединение 1, HCl	100 мг/кг	РН, <i>по</i>	6
3	Соединение 3	25 мг/кг	РН, <i>вв</i>	6
4	Соединение 1, HCl + Соединение 3	100 мг/кг 25 мг/кг	РН, <i>по</i> РН, <i>вв</i>	6

Для исследования на модели Toledo, лечения начинали в день 26 после имплантации клеток, когда средний объем опухоли составлял ~218-228 мм³. РН обозначает опсе-еженедельное. Масса тела (MT) % изменения массы тела рассчитывали согласно формуле

$$(MT_{\text{текущая}} - MT_{\text{исходная}}) / (MT_{\text{исходная}}) \times 100.$$

Данные представлены в виде изменения массы тела в процентах от дня начала лечения.

Объем опухоли и процент мышей, оставшихся в исследовании

Процентные значения лечение /контроль (Т/С) рассчитывали, используя следующую формулу:

$$\% \text{ Т/С} = 100 \times \Delta T / \Delta C, \text{ если } \Delta T > 0$$

$$\% \text{ регрессии} = 100 \times \Delta T / T_0, \text{ если } \Delta T < 0$$

где

T = средний объем опухоли группы, леченной лекарственным средством, в конечный день исследования;

ΔT = средний объем опухоли группы, леченной лекарственным средством, в конечный день исследования - средний объем опухоли группы, леченной лекарственным средством, в начальный день дозирования;

T₀ = средний объем опухоли группы, леченной лекарственным средством, в день разделения на группы;

C = средний объем опухоли контрольной группы в конечный день исследования; и

ΔC = средний объем опухоли контрольной группы в конечный день исследования - средний объем опухоли контрольной группы в начальный день дозирования.

Процент мышей, оставшихся в исследовании = 6 - Количество мышей, достигших конечной точки/6×100

Статистический анализ

Все данные выражали в виде среднего значения ± стандартная погрешность среднего (СПС). Разница (дельта) объема опухоли и процент изменения массы тела использовали для статистического анализа. Сравнения между группами осуществляли с помощью однофакторного ANOVA с последующим апостериорным критерием теста Тьюки. Для всех статистических оценок, уровень значимости устанавливали при p < 0,05. Описывали достоверность по сравнению с контрольной группой с наполнителем, если специально не указано иначе.

Результаты

Лечение	Т/С% в день 42
Наполнитель	100
Соединение 1, HCl	37
Соединение 3	102
Соединение 1, HCl + Соединение 3	3

На модели Toledo соединение 1 в виде свободного основания в дозе 100 мг/кг продуцирует статистически достоверные противоопухолевые эффекты с 37% Т/С. Соединение 3 в дозе 25 мг/кг приводит к отсутствию противоопухолевых эффектов с 102% Т/С (фиг. 7). Комбинация соединения 1 + соединения 3 приводит к опухолестазу с 3% Т/С, что является статистически достоверным по сравнению с группами, которым вводили Наполнитель, соединение 1 и соединение 3 (p<0,05, с помощью однофакторного теста ANOVA). Таким образом, комбинированное ингибирование BCL-2 и MCL1 в DLBCL может обеспечить терапевтическое преимущество в клинике. Дополнительно среднее изменение массы тела для Toledo представлено на фиг. 8. Лечение мышей с применением соединения 1, HCl и соединения 3 проявляет прирост массы тела (1,081 и 2,3% соответственно). Группа, которой вводили комбинацию, проявляет незначительную потерю массы тела (-3,2%). Других признаков побочных эффектов не наблюдали в этом

исследовании. Все 6 животных выживали во время проведения исследования.

Взятые в совокупности примеры 2, 6 и 7 показали, что комбинация MCL1 ингибитора и BCL-2 ингибитора является эффективной при переносимых дозах у мышей и крыс, несущих ксенотрансплантаты клеточных линий, имеющих происхождение из острого миелолейкоза и лимфомы человека, свидетельствуя о том, что с помощью этой комбинации достигается подходящее терапевтическое окно при этих заболеваниях.

Пример 8. Влияние *in vitro* на пролиферацию комбинации MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 13 клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML).

Материалы и методы

Клеточные линии получали из источников и поддерживали в основной среде, дополненной FBS (Фетальная бычья сыворотка), как указано в табл. 1. Дополнительно все среды содержали пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ).

Клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и выращивали в T-150 колбах. Во всех случаях, клетки размораживали из замороженных материалов, пропускали через ≥1 пассаж, используя подходящие разведения, подсчитывали и анализировали для определения жизнеспособности, используя CASY счетчик клеток перед высеиванием 150 мкл/лунку при плотностях, указанных в табл. 1, в планшеты на 96 лунок. Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматических загрязнений на собственной базе.

Маточные растворы соединений приготавливали при концентрации 5 мМ в ДМСО и хранили при -20°C.

Для анализа активности соединений в качестве единственных средств клетки высевали и обрабатывали девятью 2-кратными серийными разведениями каждого соединения, диспергированного индивидуально, непосредственно в планшеты для анализа клеток. Влияния соединений на жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня инкубирования при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo при концентрации 75 мкл реагента/лунку. Все эксперименты осуществляли в трех повторах. Люминесценцию количественно определяли на мультифункциональном планшет-ридере. IC₅₀ для единичного средства рассчитывали, используя стандартную подгонку кривой по четырем параметрам. IC₅₀ определяли как концентрацию соединения, при которой CTG сигнал уменьшается на 50% относительно такого сигнала, измеренного для контрольного наполнителя (ДМСО).

Для анализа активности соединений в комбинации, клетки высевали и лечили с применением семи или восьми 3,16-кратных серийных разведений распределенного каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке, непосредственно в планшеты для анализа клеток, как показано на фиг. 9. Эффекты агентов в виде монотерапии, а также их комбинаций в шахматном порядке на жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня инкубирования при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo при концентрации 75 мкл реагента/лунку. Осуществляли два независимых эксперимента, каждый из них проводили в двух повторах. Люминесценцию количественно определяли на мультифункциональном планшет-ридере.

Потенциальные синергические взаимодействия между комбинациями соединений оценивали, используя 2D матрицу избыточного ингибирования в соответствии с моделью аддитивности Loewe и представляли в виде Оценки Синергизма (Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666). Все расчеты осуществляли, используя Clallice™ Bioinformatics Software.

Время удвоения, указанное в табл. 3, представляет собой среднее значение времени удвоения, полученное при различных пассажах (в T-150 колбах), осуществленных из размороженных клеток при их высеивании в планшеты на 96 лунок.

Интерпретацию Оценки синергизма (Synergy Score) осуществляли следующим образом:

SS ~ 0 → Аддитивный

SS > 1 → Слабый синергизм

SS > 2 → Синергизм

Таблица 3. Идентичность и условия исследований для 13 клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML), используемых в комбинированных экспериментах

Клеточная линия	Среда (источник)	%FBS	Время удвоения (часы)	Количество высеянных клеток/лунку
MV4;11	RPMI (ATCC)	10	31,0	56520
MOLM-13	RPMI (DSMZ)	10	32,4	56520
PL-21	RPMI (DSMZ)	10	32,4	56520
ML-2	RPMI (DSMZ)	10	31,6	56520
Nomo-1	RPMI (DSMZ)	10	43,5	56520
THP-1	RPMI (ATCC)	10	49,6	56520
HL-60	IMDM (ATCC)	20	34,8	56520
Kasumi-1	RPMI (ATCC)	20	59,4	56520
OCI-AML3	MEM альфа (DSMZ)	20	25,7	56520
EOL-1	RPMI (DSMZ)	10	37,6	113040
GDM-1	RPMI (ATCC)	10	31,6	56520
KG1	IMDM (ATCC)	20	45,7	56520
KG1a	IMDM (ATCC)	20	36,5	56520

Таблица 4a. Значения IC₅₀ при монотерапии для соединения 3, соединения 1, HCl и ABT-199 в 13 AML клеточных линий представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 1, HCl		ABT-199	
	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]
MV4;11	0,01	0,001	0,1	0,03	н.д.	н.д.
MOLM-13	0,01	0,002	0,1	0,04	н.д.	н.д.
PL-21	0,10	0,065	30,0	2,78	15,0	3,300
ML-2	0,10	0,005	2,0	0,04	н.д.	н.д.
Nomo-1	0,05	0,013	30,0	7,45	15,0	5,000
THP-1	0,10	0,017	30,0	0,75	2,0	0,900
HL-60	0,10	0,025	30,0	1,42	15,0	2,100
Kasumi-1	2,00	0,033	30,0	0,77	н.д.	н.д.
OCI-AML3	2,00	0,146	30,0	8,09	15,0	8,500
EOL-1	0,10	0,001	2,0	0,04	0,2	0,004
GDM-1	0,10	0,008	2,0	0,06	н.д.	н.д.
KG1	30,00	0,390	30,0	4,70	15,0	3,400
KG1a	30,00	2,000	30,0	1,75	15,0	0,900

Таблица 4b. Значения IC₅₀ при монотерапии для соединения 4, HCl в 5 AML клеточных линий представлены. Соединение инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 4, HCl	
	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]
MV4;11	0,5	0,01
MOLM-13	0,5	0,012
ML-2	0,5	0,01
OCI-AML3	15	5,41
GDM-1	0,5	0,002

Таблица 5а. Оценки синергизма для соединения 3 и соединения 1 и комбинации в 13 AML клеточных линиях представлены. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Начальные концентрации соединения, среднее значение макс, ингибирования и среднее квадратическое отклонение (co) оценок синергизма представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 1, HCl		Комбинация (а)	
	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Среднее значение Оценки синергизма	Погрешность оценки синергизма (co)
MV4;11	0,1	100,0	0,3	99,5	4,3	0,7
MOLM-13	0,1	99,5	0,3	90,0	8,2	1,3
PL-21	0,3	91,5	5,0	75,0	17,9	2,7
ML-2	0,1	99,5	0,3	88,0	10,9	1,8
Nomo-1	0,3	97,0	5,0	31,0	11,8	1,0
THP-1	0,3	99,0	5,0	55,5	13,2	0,1
HL-60	0,3	97,5	5,0	61,5	12,9	1,7
Kasumi-1	0,3	84,5	2,0	52,5	10,5	0,5
OCI-AML3	2,0	100,0	5,0	53,5	19,8	0,2
EOL-1	0,1	100,0	1,0	100,0	5,8	0,8
GDM-1	0,1	99,0	0,3	87,0	11,1	1,4
KG1	2,0	80,5	5,0	53,0	14,6	1,7
KG1a	2,0	28,5	5,0	73,0	13,0	0,9

Таблица 5b. Оценки синергизма для соединения 3 и ABT-199 комбинации в 8 AML клеточных линиях представлены. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Начальные концентрации соединения, среднее значение макс, ингибирования и среднее квадратическое отклонение (co) оценок синергизма представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		ABT-199		Комбинация (б)	
	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Среднее значение Оценки синергизма	Погрешность оценки синергизма (co)
PL-21	0,3	89,0	2,0	41,5	19,7	2,7
Nomo-1	0,3	95,5	2,0	45,5	10,7	1,6
THP-1	0,3	97,0	0,3	47,0	12,4	0,7
HL-60	0,3	97,5	2,0	56,0	12,9	1,6
OCI-AML3	2,0	100,0	2,0	58,5	16,4	0,5
EOL-1	0,1	100,0	0,1	97,5	4,0	0,3
KG1	2,0	89,0	2,0	54,5	12,2	0,8
KG1a	2,0	57,5	2,0	73,0	17,6	0,1

Таблица 5с. Оценки синергизма для соединения 3 и соединения 4, HCl комбинация с 5 AML клеточными линиями представлены. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Начальные концентрации соединения, среднее значение макс, ингибирования и среднее квадратическое отклонение (co) оценок синергизма представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 4, HCl		Комбинация (с)	
	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Среднее значение Оценки синергизма	Погрешность оценки синергизма (co)
MV4;11	0,01	100,0	0,03	70	3,37	0,75
MOLM-13	0,1	100	0,1	99	3,84	0,02
ML-2	0,1	100	0,1	99	7,09	0,96
OCI-AML3	2,0	100,0	5,0	53,5	16,53	1,62
GDM-1	0,1	100	0,1	99	7,03	0,52

Результаты

Комбинация (а). Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора соединения 3 с BCL-2 ингибитором соединением 1 оценивали на панели 13 клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML). Соединение 3 в качестве единственного средства сильно ингибировало рост большинства 13 AML тестируемых линий (табл. 4а). Таким образом, 10 клеточных линий проявляли IC_{50} ниже 100 нМ, и

дополнительные 2 клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Только 1 клеточная линия проявляла IC_{50} выше 1 мкМ.

Соединение 1, HCl в качестве единственного средства также ингибировало рост нескольких AML тестируемых линий, хотя немного менее эффективно (табл. 4а). Таким образом, 5 клеточных линий проявляли IC_{50} ниже 100 нМ, и 2 клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Шесть клеточных линий проявляли IC_{50} выше 1 мкМ.

В комбинации лечение соединением 3 и соединением 1 HCl вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2) во всех тестируемых 13 клеточных линий (табл. 5а). В 2 клеточных линиях заметный синергетический эффект с оценками синергизма между 5 и 10. В 10 клеточных линиях, синергетический эффект является экстраординарным, достигая оценок синергизма между 10 и 19,8. Чрезвычайно важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента, и в действительности, является особенно сильным при концентрациях соединения 3 и соединения 1, которые самостоятельно не имеют антипролиферативного эффекта. Например, на OCI-AML3 клетках, соединение 3 и соединение 1 в третьей наиболее низкой тестируемой концентрации проявляет ингибирование роста на 5 и 1% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 84% (фиг. 9А, верхняя левая панель), таким образом, являясь на 79% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 9А, верхняя правая панель).

Кроме того, следует отметить, что Синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств, которые должны оказаться полезными *in vivo* по отношению к гибкости касательно уровней и схем дозирования.

В заключение, комбинация соединения 3 и соединения 1 обеспечивает синергетическое ингибирование роста во всех 13 AML тестируемых клеточных линиях. Чрезвычайно важно, экстраординарное синергетическое ингибирование роста наблюдали в большинстве тестируемых AML клеточных линий (10/13).

Комбинация (б). Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора соединения 3 с BCL-2 ингибитором ABT-199 оценивали на панели 8 клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML).

Соединение 3 в качестве единственного средства сильно ингибировало рост большинства из 8 AML тестируемых линий (табл. 4а). Таким образом, 5 клеточных линий проявляли IC_{50} ниже 100 нМ, и дополнительные 2 клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Только 1 клеточная линия проявляла IC_{50} выше 1 мкМ.

ABT-199 в качестве единственного средства также ингибировал рост AML линий, хотя с меньшей эффективностью (табл. 4а). Таким образом, только одна клеточная линия проявляла IC_{50} ниже 100 нМ, и 2 клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Пять клеточных линий проявляли IC_{50} выше 1 мкМ.

В комбинации лечение MCL1 ингибитором и ABT-199 вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2) на всей панели 8 тестируемых клеточных линий (табл. 5b). В большинстве клеточных линий, синергетический эффект является экстраординарным, достигая оценок синергизма между 10 и 17,6. Чрезвычайно важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента, и в действительности, является особенно сильным при концентрациях MCL1 ингибитора и ABT-199, которые самостоятельно не имеют антипролиферативного эффекта. Например, в OCI-AML3 клетках, MCL1 и ABT-199 в третьей наиболее низкой тестируемой концентрации проявляет ингибирование роста на 26 и 18% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 91% (фиг. 13, верхняя левая панель). Кроме того, следует отметить, что синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств, которые должны оказаться полезными *in vivo* по отношению к гибкости касательно уровней и схем дозирования.

В заключение, комбинация соединения 3 и ABT-199 обеспечивает синергетическое ингибирование роста во всех 8 тестируемых AML клеточных линиях. Чрезвычайно важно, экстраординарное синергетическое ингибирование роста наблюдали в большинстве тестируемых AML клеточных линий (7/8).

Комбинация (с). Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора соединения 3 с BCL-2 ингибитором соединением 4 оценивали на панели 5 клеточных линий острого миелоидного лейкоза (AML).

Соединение 3 в качестве единственного средства сильно ингибировало рост 5 AML тестируемых линий (табл. 4b). Таким образом, все клеточные линии проявляли IC_{50} ниже 200 нМ. Соединение 4, HCl в качестве единственного средства также ингибировало рост 4 из 5 тестируемых клеточных линий с IC_{50} ниже или равным 40 нМ, одна клеточная линия является резистентной к соединению 4 с IC_{50} 10 мкМ. В комбинации, лечение соединением 3 и соединением 4, HCl вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2) во всех 5 тестируемых клеточных линиях (табл. 5с). В 2 клеточных линиях заметный синергетический эффект, с оценками синергизма между 5 и 10. В 1 клеточной линии, синергетический эффект является экстраординарным, обеспечивая оценку синергизма 16,5. Чрезвычайно

важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента и в действительности является особенно сильным при концентрациях соединения 4, HCl и соединения 3, которые самостоятельно не имеют или имеют низкий антипролиферативный эффект. Например, в OCI-AML3 клетках соединение 4, HCl и соединение 3 в третьей наиболее низкой тестируемой концентрации проявляет ингибирование роста на 1 и 40% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 98% (фиг. 1А, левая панель; характерно для двух независимых экспериментов), таким образом, являясь на 53% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 14А, правая панель). В ML-2, соединение 4, HCl и соединение 3 в пятой наиболее низкой тестируемой концентрации проявляет ингибирование роста на 18 и 26% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 100% (фиг. 14В, левая панель; характерно для двух независимых экспериментов), таким образом, являясь на 51% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 15, правая панель).

В заключение, комбинация соединения 4 и соединения 3 обеспечивает синергетическое ингибирование роста во всех 5 тестируемых AML клеточных линиях.

Пример 9. Эффект *in vitro* на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 12 клеточных линий нейробластомы (NB)

Материалы и методы

Клеточные линии получали из источников и поддерживали в основной среде, дополненной FBS, как указано в табл. 1. Дополнительно, все среды содержали пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ). Клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и выращивали в T-150 колбах. Во всех случаях, клетки размораживали из замороженных материалов, пропускали через ≥1 пассаж, используя подходящие разведения, подсчитывали и анализировали для определения жизнеспособности, используя CASY счетчик клеток перед высеванием 150 мкл/лунку при плотностях, указанных в табл. 6 в планшеты на 96 лунок. Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматических загрязнений на собственной базе.

Маточные растворы соединений приготавливали при концентрации 5 мМ в ДМСО и хранили при -20°C. Для анализа активности соединений в качестве единственных средств, клетки высевали и лечили с применением девяти 3,16-кратных серийных разведений каждого соединения, диспергированного индивидуально, непосредственно в планшеты для анализа клеток. Влияния соединений на жизнеспособность клеток оценивали через 2 или 3 дня инкубирования (как указано в табл. 6) при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo в количестве 150 мкл реагента/лунку.

Проводили два независимых эксперимента, каждый из них осуществляли в двух повторах. Все эксперименты осуществляли в трех повторах. Люминесценцию количественно определяли на многофункциональном планшет-ридере. IC₅₀ для отдельных агентов в качестве монотерапии рассчитывали, используя стандартную подгонку кривой по четырем параметрам. IC₅₀ определяли как концентрацию соединения, при которой CTG сигнал уменьшается на 50% относительно такого сигнала, измеренного для контрольного наполнителя (ДМСО).

Осуществляли идентичные эксперименты для оценки потенциальных синергических взаимодействий между комбинациями соединений. Проводили оценку синергизма, используя 2D матрицу избыточного ингибирования в соответствии с моделью аддитивности Loewe (Lehar и др., Nat Biotechnol. Июль 2009 г.; 27(7): 659-666). Все расчеты осуществляли, используя программное обеспечение Chalice TM Bioinformatics.

Время удвоения, указанное в табл. 6, представляет собой среднее значение времени удвоения, полученное при различных пассажах (в T-150 колбах), осуществленных из размороженных клеток при их высевании в планшеты на 96 лунок.

Интерпретацию оценки синергизма (Synergy Score) осуществляли следующим образом:

SS~0→Аддитивный

SS>1→Слабый синергизм

SS>2→Синергизм

Таблица 6. Идентичность и условия исследований для 12 клеточных линий нейробластомы (NB), используемых в комбинированных экспериментах

Клеточная линия	Среда (источник)	%FBS	Время удвоения (часы)	Количество высеванных клеток/лунку	Дни инкубирования с соед.
SK-N-AS	DMEM (ATCC)	10	33	9375	3
SK-N-BE	EMEM/Ham F12 (ATCC)	10	50	37500	3
SK-N-DZ	DMEM (ATCC)	10	42	37500	3
LAN-6	DMEM (DSMZ)	20	100	9375	3
NBL-S	MDM Искова (DSMZ)	10	46	18750	3
SIMA	RPMI (DSMZ)	10	60	18750	3
KELLY	RPMI (ECACC)	10	34	3750	2
IMR-32	EMEM (ATCC)	10	55	28125	2
SH-SY-5Y	1/2 EMEM без глутамин + 1/2 Ham F12 + 2 mM Глутамин + NEAA (ECACC)	15	35	3750	2
SK-N-SH	EMEM (ATCC)	10	65	3750	2
NB-1	RPMI (JCRB)	10	35	15000	2
SK-N-FI	DMEM (ATCC)	10	60	7500	2

Таблица 7. Значения IC₅₀ при монотерапии для соединения 3 и соединения 1, HCl, представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 2 или 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 3	Соединение 1, HCl
	IC ₅₀ [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]
SK-N-AS	0,26	> 1
SK-N-BE	>2	>2
SK-N-DZ	>2	>2
LAN-6	>2	>2
NBL-S	>2	>2
SIMA	>2	>2
NB1	0,123	>3
SK-N-SH	>3	>3
SH-SY5Y	>3	>3
Kelly	0,031	>3
SK-N-FI	>3	>3

Таблица 8. Представлены оценки синергизма для комбинации с соединением 3 и соединением 1, HCl. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Соединения инкубировали с клетками в течение 2 или 3 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 1, HCl		Комбинация	
	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Макс Инг [%]	Оценка синергизма	Погрешность оценки синергизма
SK-N-AS	2	84	1	9	2,78	0,46
SK-N-BE	2	27	2	27	10,72	0,78
SK-N-DZ	2	2,5	2	10	0,34	0,06
LAN-6	2	17,5	2	26	10,51	0,39
NBL-S	2	13	2	10	17,81	3,7
SIMA	2	0	2	48,5	2,41	0,75
NB1	3	99	3	11	10,72	4,33
SK-N-SH	3	40	3	15	4,07	0,23
SH-SY5Y	3	24	3	10	10,21	0,54
Kelly	3	99	3	27	9,62	0,48
SK-N-FI	3	33	3	6	4,35	0,91

Результаты

Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора соединения 3 с BCL-2 ингибитором соединением 1 оценивали на панели 12 клеточных линий нейробластомы. Три из 12 тестируемых клеточных линий являются чувствительными к соединению 3 в качестве единственного средства (табл. 7). Одна клеточная линия проявляла IC₅₀ ниже 100 нМ, и дополнительные 2 клеточные линии проявляли IC₅₀ между 100 нМ и 1 мкМ.

Все клеточные линии являются резистентными к соединению 1, HCl в качестве единственного средства, где все тестируемые клеточные линии проявляют IC₅₀ выше 1 мкМ. В комбинации лечение с применением соединения 3 и соединения 1 вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка

синергизма выше 2 - Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666) в 11 из 12 NB тестируемых клеточных линий (табл. 8). В 5 клеточных линиях, синергетический эффект является экстраординарным, достигая оценок синергизма между 10 и 17,81. Чрезвычайно важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента, и в действительности, является особенно сильным при концентрациях соединения 3 и соединения 1, HCl, которые самостоятельно не имеют антипролиферативного эффекта. Например, в LAN-6 клетках, соединение 3 и соединение 1, HCl при 630 нМ проявляет ингибирование роста только на 12 и 0% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 95% (фиг. 10, верхняя левая панель), таким образом, являясь на 76% выше аддитивности, рассчитанной на основании активности отдельно взятых средств (фиг. 10, верхняя правая панель). В заключение, комбинация соединения 3 и соединения 1 обеспечивает от сильного до экстраординарного синергетического ингибирования роста в большинстве тестируемых нейробластомных клеточных линиях.

Пример 10. Эффект *in vitro* на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 8 клеточных линий В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (B-ALL) и 10 клеточных линий Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (T-ALL).

Материалы и методы

Клеточные линии получали из источников и поддерживали в основной среде, дополненной FBS, как указано в табл. 1. Дополнительно все среды содержали пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ). Клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и выращивали в T-150 колбах. Во всех случаях клетки размораживали из замороженных материалов, пропускали через ≥ 1 пассаж, используя подходящие разведения, подсчитывали и анализировали для определения жизнеспособности, используя CASY счетчик клеток перед высеванием 150 мкл/лунку при плотностях, указанных в табл. 9 в планшеты на 96 лунок. Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматических загрязнений на собственной базе.

Маточные растворы соединений приготавливали при концентрации 5 мМ в ДМСО и хранили при -20°C. Для анализа активности соединений в качестве единственных средств клетки высевали и обрабатывали девятью 2-кратными серийными разведениями каждого соединения, диспергированного индивидуально, непосредственно в планшеты для анализа клеток. Влияния соединений на жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня инкубирования при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo при концентрации 75 мкл реагента/лунку. Все условия тестировали в трех повторах. Люминесценцию количественно определяли на мультифункциональном планшет-ридере. Рассчитывали IC₅₀ для единичных агентов в качестве монотерапии, используя стандартную подгонку кривой по четырем параметрам. IC₅₀ определяли как концентрацию соединения, при которой CTG сигнал уменьшается на 50% относительно такого сигнала, измеренного для контрольного наполнителя (ДМСО).

Для анализа активности соединений в комбинации, клетки высевали и лечили с применением семи или восьми 3,16-кратных серийных разведений распределенного каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке, непосредственно в планшеты для анализа клеток, как показано на фиг. 1. Эффекты агентов в виде монотерапии, а также их комбинаций в шахматном порядке на жизнеспособность клеток оценивали через 3 дня инкубирования при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo при концентрации 75 мкл реагента/лунку. Для B-ALL клеточных линий, осуществляли два независимых эксперимента, каждый из них проводили в двух повторах. Для T-ALL клеточных линий, один осуществленный эксперимент проводили в трех повторах. Люминесценцию количественно определяли на мультифункциональном планшет-ридере.

Потенциальные синергические взаимодействия между комбинациями соединений оценивали, используя 2D матрицу избыточного ингибирования в соответствии с моделью аддитивности Loewe и представляли в виде Оценки Синергизма (Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666). Все расчеты осуществляли, используя программное обеспечение Chalice TM Bioinformatics, доступное на веб-сайте Horizon.

Время удвоения, указанное в табл. 9, представляет собой среднее значение времени удвоения, полученное при различных пассажах (в T-150 колбах), осуществленных из размороженных клеток при их высевании в планшеты на 96 лунок.

Интерпретацию оценки синергизма (Synergy Score) осуществляли следующим образом:

SS~0→Аддитивный

SS>1→Слабый синергизм

SS>2→Синергизм

Таблица 9. Идентичность и условия исследований для 8 B-ALL и 10 T-ALL клеточных линий, используемых в комбинированных экспериментах

Клеточная линия	Тип рака	Среда (источник)	%FBS	Время удвоения (часы)	Количество высеванных клеток/лунку
TOM-1	B-ALL	RPMI (DSMZ)	20	70,0	112500
SUP-B15	B-ALL	McCoy (DSMZ)	20	35,0	112500
NALM-21	B-ALL	RPMI (DSMZ)	10	50,0	112500
NALM-6	B-ALL	RPMI (DSMZ)	10	27,0	56250
TANOUE	B-ALL	RPMI (DSMZ)	10	26,0	30000
Kasumi-2	B-ALL	RPMI (DSMZ)	10	52,0	112500
RS4;11	B-ALL	RPMI (ATCC)	10	42,0	90000
BALL-1	B-ALL	RPMI (DSMZ)	10	38,0	112500
BE-13	T-ALL	RPMI 1640 (DSMZ)	10	37,0	13875
MOLT-4	T-ALL	RPMI 1640 (ATCC)	10	24,0	28125
TALL-104	T-ALL	IMDM (ATCC)	20	68,0	13875
HPB-ALL	T-ALL	RPMI 1640 (DSMZ)	20	42,0	56250
DND-41	T-ALL	RPMI 1640 (DSMZ)	10	38,0	56250
CML-T1	T-ALL	RPMI 1640 (DSMZ)	10	32,0	112500
J45.01	T-ALL	RPMI 1640 (ATCC)	10	25,0	56250
CCRF-CEM	T-ALL	RPMI 1640 (ATCC)	10	24,0	56250
J.RT3 T3.5	T-ALL	RPMI 1640 (ATCC)	10	24,0	56250
Loucy	T-ALL	RPMI 1640 (ATCC)	10	61,0	112500

Таблица 10. Представлены значения IC_{50} при монотерапии для соединения 3 и соединения 1, HCl в 8 B-ALL и 10 T-ALL клеточных линиях. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Тип рака	Продолжительность лечения (ч)	Соединение 3		Соединение 1, HCl	
			Нач. конц. [мкМ]	IC_{50} [мкМ]	Нач. конц. [мкМ]	IC_{50} [мкМ]
TOM-1	B-ALL	72	0,10	0,024	0,15	0,019
SUP-B15	B-ALL	72	2,00	0,078	0,90	0,025
NALM-21	B-ALL	72	0,10	0,012	0,50	0,095
NALM-6	B-ALL	72	2,00	0,120	30,00	3,630
TANOUE	B-ALL	72	30,00	6,540	30,00	17,000
Kasumi-2	B-ALL	72	2,00	0,030	2,00	0,209
RS4;11	B-ALL	72	0,90	0,079	9,00	0,020
BALL-1	B-ALL	72	0,25	0,063	0,10	0,019
BE-13	T-ALL	72	0,15	0,015	30,00	6,700
MOLT-4	T-ALL	72	2,00	0,026	30,00	3,290
TALL-104	T-ALL	72	2,00	0,044	30,00	15,900
HPB-ALL	T-ALL	72	2,00	0,660	30,00	4,500
DND-41	T-ALL	72	30,00	7,000	30,00	9,000
CML-T1	T-ALL	72	30,00	6,000	30,00	15,000
J45.01	T-ALL	48	0,60	0,029	30,00	9,000
CCRF-CEM	T-ALL	48	0,90	0,047	30,00	7,500
J.RT3 T3.5	T-ALL	48	1,88	0,063	30,00	10,000
Loucy	T-ALL	48	0,90	0,064	3,75	0,231

Таблица 11. Представлены оценки синергизма для соединения 3 и соединения 1, HCl и комбинации в 8 B-ALL и 10 T-ALL клеточных линиях. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Начальные концентрации соединения, среднее значение макс, ингибирования и среднее квадратическое отклонение (co) оценок синергизма представлены. Соединения инкубировали с клетками в течение 3 дней.

Клеточная линия	Тип рака	Продолжительность лечения (ч)	Соединение 3		Соединение 1, HCl		Комбинация	
			Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Среднее Макс Инг [%]	Средняя Оценка синергизма	Погреш-оценки синергизма (co)
TOM-1	B-ALL	72	0,3	98,5	0,1	90,5	4,1	0,4
SUP-B15	B-ALL	72	2,0	99,0	0,3	97,0	5,6	0,4
NALM-21	B-ALL	72	0,3	99,0	0,3	84,5	9,6	0,0
NALM-6	B-ALL	72	2,0	71,5	5,0	56,5	15,9	1,4
TANOUE	B-ALL	72	5,0	78,5	5,0	13,0	1,0	0,6
Kasumi-2	B-ALL	72	0,3	99,0	2,0	82,0	10,1	1,9
RS4;11	B-ALL	72	0,3	87,5	0,3	98,0	7,0	1,3
BALL-1	B-ALL	72	0,3	96,0	0,3	100,0	6,3	0,3
BE-13	T-ALL	72	1,0	95,0	5,0	0,0	8,8	0,4
MOLT-4	T-ALL	72	1,0	99,0	5,0	63,0	4,4	0,1
TALL-104	T-ALL	72	1,0	99,0	2,0	29,0	15,1	0,5
HPB-ALL	T-ALL	72	1,0	49,0	5,0	15,0	5,6	0,3
DND-41	T-ALL	72	2,0	17,0	5,0	24,0	10,3	0,3
CML-T1	T-ALL	72	2,0	22,3	5,0	17,0	3,3	0,2
J45.01	T-ALL	48	2,0	100,0	2,0	23,0	2,9	0,1
CCRF-CEM	T-ALL	48	2,0	92,0	2,0	55,0	4,1	1,0
J.RT3 T3.5	T-ALL	48	2,0	99,0	2,0	32,0	3,8	0,1
Loucy	T-ALL	48	2,0	100,0	2,0	77,0	11,3	0,6

Результаты

Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором оценивали на панели 8 B-ALL и 10 T-ALL клеточных линий. MCL1 ингибитор в качестве единственного средства сильно ингибировал рост большинства тестируемых ALL клеточных линий (табл. 10). Таким образом, 13 ALL клеточных линий проявляли IC_{50} ниже 100 нМ, и дополнительные 2 ALL клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Только 3 ALL клеточные линии проявляли IC_{50} выше 1 мкМ.

BCL-2 ингибитор в качестве единственного средства также ингибировал рост нескольких тестируемых ALL клеточных линий, хотя он был менее эффективным (табл. 10). Таким образом, 5 клеточных линий проявляли IC_{50} ниже 100 нМ и 2 клеточные линии проявляли IC_{50} между 100 нМ и 1 мкМ. Одинадцать ALL клеточных линий проявляли IC_{50} выше 1 мкМ. В комбинации лечение с применением MCL1 ингибитора и BCL-2 ингибитора вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2 - Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666) во всех тестируемых 17/18 ALL клеточных линиях (табл. 11). В 6 клеточных линиях, заметный синергетический эффект, с оценками синергизма между 5 и 10. В 5 клеточных линиях, синергетический эффект является экстраординарным, достигая оценок синергизма между 10 и 15,9. Чрезвычайно важно, что синергизм не зависит от антипролиферативных эффектов единичного агента, и в действительности, является особенно сильным при концентрациях MCL1 ингибитора и BCL-2 ингибитора, которые самостоятельно не имеют антипролиферативного эффекта. Например, в NALM-6 клетках, MCL1 ингибитор и BCL-2 ингибитор в четвертой наиболее низкой тестируемой концентрации проявляет ингибирование роста на 6 и 8% соответственно, в то время как соответствующая комбинация из двух соединений обеспечивает ингибирование роста на 61% (фиг. 11, верхняя левая панель).

Кроме того, следует отметить, что синергетические эффекты проявляются для широкого диапазона концентраций отдельно взятых средств, которые должны оказаться полезными *in vivo* по отношению к гибкости касательно уровней и схем дозирования.

В заключение, комбинация MCL1 ингибитора и BCL-2 ингибитора обеспечивает синергетическое ингибирование роста в большинстве (17/18) тестируемых ALL клеточных линиях. Чрезвычайно важно, экстраординарное синергетическое ингибирование роста наблюдали в 5/18 тестируемых ALL клеточных линиях.

Пример 11. Влияние *in vitro* на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 5 клеточных линий лимфомы из клеток зоны мантии (MCL).

Материалы и методы

Клеточные линии получали из источников и поддерживали в основной среде, дополненной FBS, как указано в табл. 12. Дополнительно, все среды содержали пенициллин (100 МЕ/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ).

Клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и вы-

рачивали в T-150 колбах. Во всех случаях, клетки размораживали из замороженных материалов, пропускали через ≥ 1 пассаж, используя подходящие разведения, подсчитывали и анализировали для определения жизнеспособности, используя CASY счетчик клеток перед высеванием 150 мкл/лунку при плотностях, указанных в табл. 12 в планшеты на 96 лунок. Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматических загрязнений на собственной базе.

Маточные растворы соединений приготавливали при концентрации 5 мМ в ДМСО и хранили при -20°C. Для анализа активности соединений в качестве единственных средств или в комбинации, клетки высевали и лечили с применением семи или восьми 3,16-кратных серийных разведений распределенного каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке, непосредственно в планшеты для анализа клеток. Эффекты агентов в виде монотерапии, а также их комбинаций в шахматном порядке на жизнеспособность клеток оценивали после инкубирования в течение 2 дней при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ, используя CellTiterGlo в количестве 150 мкл реагента/лунку. Все условия тестировали в трех повторах. Люминесценцию количественно определяли на мультифункциональном планшет-ридере. Потенциальные синергические взаимодействия между комбинациями соединений оценивали, используя 2D матрицу избыточного ингибирования в соответствии с моделью аддитивности Loewe и представляли в виде оценки Синергизма (Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666). Все расчеты осуществляли, используя Chalice™ Bioinformatics программное обеспечение, доступное на веб-сайте Horizon.

Рассчитывали IC₅₀ для единичных агентов в качестве монотерапии, используя стандартную подгонку кривой по четырем параметрам. IC₅₀ определяли как концентрацию соединения, при которой CTG сигнал уменьшается на 50% относительно такого сигнала, измеренного для контрольного наполнителя (ДМСО).

Время удвоения, указанное в табл. 12, представляет собой среднее значение времени удвоения, полученное при различных пассажах (в T-150 колбах), осуществленных из размороженных клеток при их высевании в планшеты на 96 лунок.

Оценка синергизма

SS~0→Аддитивный

SS>1→Слабый синергизм

SS>2→Синергизм

Таблица 12. Идентичность и условия исследований для 5 клеточных линий лимфомы из клеток зоны мантии, используемых в комбинированных экспериментах

Клеточная линия	Среда	%FBS	Источник	Время удвоения (часы)	Количество высеянных клеток/лунку
Z-138	RPMI	10	ATCC	22,5	37500
Jeko	RPMI	20	ATCC	26,0	27000
Mino	RPMI	15	ATCC	31,1	56250
JVM-2	RPMI	10	ATCC	76,0	56250
REC-1	RPMI	10	ATCC	36,0	56250

Таблица 13. Представлены значения IC₅₀ при монотерапии для соединения 3 и соединения 1, HCl в 5 клеточных линиях лимфомы из клеток зоны мантии. Соединения инкубировали с клетками в течение 2 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 1, HCl	
	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]	Нач. конц. [мкМ]	IC ₅₀ [мкМ]
Z-138	2	0,448	5	> 5
Jeko	2	0,023	5	> 5
Mino	2	0,008	2	0,091
JVM-2	2	>2	5	> 5
REC-1	2	0,077	2	0,703

Таблица 14. Представлены оценки синергизма для соединения 3 и соединения 1, HCl комбинация в 5 клеточных линиях лимфомы из клеток зоны мантии. Взаимодействия интерпретируются как синергетические, если наблюдаемые оценки $\geq 2,0$. Представлены начальные концентрации соединений, максимальное ингибирование и оценки синергизма. Соединения инкубировали с клетками в течение 2 дней.

Клеточная линия	Соединение 3		Соединение 1, HCl		Комбинация Оценка синергизма
	Нач. конц. [мкМ]	Макс Инг [%]	Нач. конц. [мкМ]	Макс Инг [%]	
Z-138	2,0	96,0	5,0	25,0	11,1
Jeko	2,0	100,0	5,0	35,0	9,7
Mino	2,0	100,0	2,0	91,0	5,7
JVM-2	2,0	19,0	5,0	38,0	3,4
REC-1	2,0	99,0	2,0	78,0	5,1

Результаты

Влияние на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором оценивали на панели 5 клеточных линий лимфомы из клеток зоны мантии.

В качестве единственного средства MCL1 ингибиторы проявляли более высокую активность по сравнению с BCL-2 ингибитором. Таким образом, 3 клеточные линии проявляли IC_{50} ниже 100 нМ для MCL1 ингибитора, в то время как только одна клеточная линия проявляла IC_{50} ниже 100 нМ для BCL-2 ингибитора (табл. 13).

В комбинации, лечение с применением MCL1 ингибитора и BCL-2 ингибитора вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2 - Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666) во всех тестируемых клеточных линиях (табл. 14), как проиллюстрировано на фиг. 12. Чрезвычайно важно, в 4/5 клеточных линиях, заметный синергетический эффект, с Оценками синергизма выше 5.

Пример 12. Влияние *in vitro* на пролиферацию комбинирования MCL1 ингибитора с BCL-2 ингибитором на панели 5 клеточных линий мелкоклеточного рак лёгкого (SCLC).

Все клеточные линии получали от ATCC. Культуральную среду, содержащую RPMI1640 (Invitrogen), дополненную 10% FBS (HyClone), использовали для COR-L95, NCI-H146, NCI-H211, SHP-77, SW1271, NCI-H1339, NCI-H1963 и NCI-H889. Культуральную среду, содержащую Waymouth MB 752/1 (Invitrogen) с 10% FBS, использовали для DMS-273. Культуральную среду, содержащую DMEM/F12 (Invitrogen), содержащую 5% FBS и дополненную 0,005 мг/мл инсулина, 0,01 мг/мл трансферрина, и 30 нМ раствора селенита натрия (Invitrogen), 10 нМ гидрокортизона (Sigma), 10 нМ бета-эстрадиола (Sigma), и 2 мМ L-глутамин (HyClone), использовали для NCI-H1105.

Клеточные линии культивировали при 37°C и 5% CO₂ инкубаторе и выращивали в T-75 колбах. Во всех случаях, клетки размораживали из замороженных материалов, пропускали через ≥ 1 пассаж, используя 1:3 разведения, подсчитывали и анализировали для определения жизнеспособности, используя ViCell счетчик (Beckman-Coulter), перед высеванием в 384-лунки. Для размножения и выращивания клеточные линии, клетки отсоединяли от колб, используя 0,25% Трипсин-EDTA (GIBCO). Все клеточные линии определяли как не содержащие микоплазматические загрязнения, что определяли с помощью методологии ПЦР обнаружения, анализируя на Idexx Radii (Columbia, MO, USA) и корректно идентифицировали путем обнаружения панели SNP. Пролиферация клеток измеряли в течение 72 ч в CellTiter-Glo™ (CTG) анализах (Promega G7571) и все представленные результаты выражали результат измерений по меньшей мере в трех повторах. Для анализов CellTiter-Glo™, клетки распределяли в культуру леченных тканей в планшетах на 384 лунки (Corning 3707) с конечным объемом 35 мкл среды и при плотности 5000 клеток на лунку. Через 24 ч после посева по 5 мкл серий разведений каждого соединения переносили в планшеты, содержащие клетки, что приводило к получению концентраций соединений в интервале 0-10 мкМ и конечной концентрации ДМСО (Sigma D8418) 0,16%. Планшеты инкубировали в течение 72 ч и влияние соединений на пролиферацию клеток определяли, используя люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™ (Promega G7571) и Envision планшет-ридер (Perkin Elmer).

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® представляет собой гомогенный метод для определения количества жизнеспособных клеток в культуре на основании количественного определения присутствующего АТФ, что сигнализирует о присутствии метаболически активных клеток. Метод подробно описан в Technical Bulletin, TB288 Promega. Вкратце, клетки высевали в многолуночный планшет со светонепроницаемыми стенками в культуральную среду, как описано выше. Также приготавливали контрольные лунки, содержащие среду без клеток, для получения значения фоновой люминесценции. После этого добавляли 15 мкл CellTiter-Glo® реагента и содержимое смешивали в течение 10 мин на орбитальном встряхивателе на индуцирование лизиса клеток. После этого записывали люминесценцию, используя планшет-ридер.

Процент ингибирования роста и избыточное ингибирование анализировали, используя программное обеспечение Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA). Процентное значение ингибирования роста относительно ДМСО проявляли на панели меченного ингибирования, и количество ингибирования в избытке рассчитанного количества на панели меченного ADD избыточного ингибирования (фиг. 15 (a)-(e)). Концентрации Соединения 1, HCl представлены в нижней строке слева направо и возрастающие концентрации соединения 3 в крайней слева колонке снизу вверх. Все оставшиеся точки в системе данных представляют собой результаты действия комбинации двух ингибиторов, что соответствуют концентрациям отдельных агентов, представленных на двух осях. Анализ данных пролиферации клеток осуществляли, используя анализатор Chalice, как описано в Lehar и др., Nat Biotechnol. июль 2009 г.; 27(7): 659-666. Избыточное ингибирование рассчитывали, используя модель синергизма Loewe, которая измеряет влияние на рост относительно тех значений, которые предполагают получить, если два лекарственных средства ведут себя аддитивным образом в зависимости от дозы. Положительные числа представляют собой площади возрастающего синергизма.

Оценка синергизма

SS~0→Аддитивная доза
 SS>2→Синергизм
 SS>1→Слабый синергизм

Результаты

В комбинации, лечение с применением соединения 1 и соединения 3 вызывает синергическое ингибирование роста (то есть оценка синергизма выше 2) в 8/10 клеточных линий мелкоклочный рак лёгкого. Чрезвычайно важно, в 6 клеточных линиях, заметный синергетический эффект, с оценками синергизма выше 6.

Пример 13. Влияние *in vivo* на модели имеющих происхождение от пациента первичных AML HAMLX5343 с применением комбинации MCL1 ингибитора (соединение 3) и BCL-2 ингибитора (соединение 1, HCl или ABT-199)

Материалы и методы

Материалы

Животные

NOD scid гамма (NSG) самкам мышей весом 17-27 г (Jackson Laboratories) предоставляли возможность акклиматизироваться с доступом к корму и воде *ad libitum* в течение 3 дней перед манипуляциями.

Первичные модели опухолей

Имеющие происхождение от пациента первичные AML модели HAMLX5343 несущие KRAS мутацию и дикий тип FLT3 получали из Dana Farber Cancer Institute.

Тестируемые соединения, препараты

Соединение 1, HCl приготавливали в 5% Этаноле, 20% Dexolve-7 в виде раствора для внутривенного введения или приготавливали в PEG300/EtOH/воде (40/10/50) для перорального введения. ABT-199 приготавливали в PEG300/EtOH/воде (40/10/50) для перорального введения. Все они были стабильными по меньшей мере в течение одной недели при 4°C. Соединение 3 приготавливали в липосомальном препарате в виде раствора для внутривенного препарата, который является стабильным в течение трех недель при 4°C.

Наполнитель и дозированные растворы соединений приготавливали при необходимости. Всем животным вводили дозу 10 мл/кг соединения 1 (выраженного в виде свободного основания) или ABT-199, или 5 мл/кг для соединения 3.

Методы

Схема эксперимента

Восемь леченных групп использовали в исследовании 7844HAMLX5343-XEF, как обобщено в табл. 15. Все лечения начинали при достижении средней опухолевой нагрузки (%CD-45 положительных клеток) в интервале от 8 до 15%.

В этом исследовании соединение 1 вводили путем перорального принудительного введения (по) или внутривенного введения в дозе 50 мг/кг один раз в неделю, ABT-199 вводили в дозе 25 мг/кг путем перорального принудительного введения (po) один раз в неделю, либо в качестве единичного средства или в комбинации с соединением 3 в дозе 12,5 мг/кг один раз в неделю, соответственно, в течение 18 дней.

Оба, как соединение 1 (выраженное в виде свободного основания), так и ABT-199 вводили в дозе 10 мл/кг. Соединение 3 вводили в дозе 5 мл/кг. Дозу корректировали на массу тела. Массу тела записывали два раза в неделю и опухолевую нагрузку записывали один раз в неделю.

Таблица 15. Дозы* и схемы дозирования для 7844HAMLX5343-XEF

Леченные группы	Количество животных	Схема дозирования
Наполнитель (10 мл/кг)	4	RH
Соединение 1 (50 мг/кг по)	4	RH
Соединение 1 (50 мг/кг вв)	4	RH
ABT-199 (25 мг/кг по)	4	RH
Соединение 3 (12,5 мг/кг вв)	4	RH
Соединение 1 + Соединение 3 (по/вв)	4	RH + RH
Соединение 1 + Соединение 3 (вв/вв)	4	RH + RH
ABT-199 + Соединение 3 (по/вв)	4	RH + RH

* Дозы представлены в виде свободного основания

Первичная модель AML

Для этого эксперимента, 32 мышам имплантировали первичную AML линию HAMLX5343. Мышам инъецировали внутривенно 2,0 млн лейкозных клеток. Когда опухолевая нагрузка достигала 8-15%, животных рандомизировали на восемь групп по четыре животных в каждую для наполнителя, соединения 1 (по), соединения 1 (вв), ABT-199, соединения 3, или комбинированного лечения. После осуществления лечения в течение 18 дней исследование останавливали, если опухолевая нагрузка достигала 99%. Опухолевую нагрузку определяли с помощью FACS анализа.

Наблюдения за животными

Состояние и поведение животных, включая уход за внешним видом и способность передвигаться, мониторили два раза в день. Наблюдали за общим состоянием здоровья мышей и записывали смертность ежедневно. Любых умирающих животных умертвляли.

Измерение опухоли

У мышей отбирали образцы крови путем надреза хвоста один раз в неделю. Кровь вносили в IgG контрольную лунку и CD33/CD45 лунку планшета на 96 лунок. Кровь лизировали с помощью 200 мкл RBC лизирующего буфера два раза при 4°C, затем промывали один раз с помощью FACS буфера (5% FBS в PBS). После этого образцы инкубировали в течение 10-30 мин при 4°C в 100 мкл блокирующего буфера (5% мышиного Fc Block + 5% человеческого Fc Block + 90% FACS буфера). 20 мкл контрольной смеси IgG (2,5 мкл мышиного IgG1 К изотипного контроля -PE + 2,5 мкл мышиного IgG1 К изотипного контроля-APC + 15 мкл FACS буфера) добавляли в IgG контрольные лунки и 20 мкл CD33/CD45 смеси (2,5 мкл мышиных античеловеческих CD33-PE + 2,5 мкл мышиных античеловеческих CD45-APC + 15 мкл FACS буфера). Образцы инкубировали в течение 30-60 мин при 4°C, затем промывали два раза перед проведением анализа. Образцы прогоняли на Sauto с помощью FACSDiva программного обеспечения. Анализ осуществляли с помощью FloJo программного обеспечения. Процент CD45-положительных, живых, единичных клеток описывали в виде опухолевой нагрузки.

Анализ данных

Процентное значение лечение /контроль (Т/С) рассчитывали, используя следующую формулу:

$$\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C, \text{ если } \Delta T > 0$$

$$\% \text{ Регрессии} = 100 \times \Delta T/T_{\text{начальное}}, \text{ если } \Delta T < 0$$

где

T = средняя опухолевая нагрузка группы, леченной лекарственным средством, в конечный день исследования;

ΔT = средняя опухолевая нагрузка группы, леченной лекарственным средством, в конечный день исследования - средняя опухолевая нагрузка группы, леченной лекарственным средством, в начальный день дозирования;

$T_{\text{начальное}}$ = средняя опухолевая нагрузка группы, леченной лекарственным средством, в начальный день дозирования;

C = средняя опухолевая нагрузка контрольной группы в конечный день исследования и

ΔC = средняя опухолевая нагрузка контрольной группы в конечный день исследования - средняя опухолевая нагрузка контрольной группы в начальный день дозирования.

Все данные выражали в виде среднего значения $\pm$ СПС. Разницу (дельта) опухолевой нагрузки и массы тела использовали для статистического анализа.

Осуществляли сравнения между группами для конечных измерений, используя ANOVA с критерием Тьюки. Статистический анализ осуществляли, используя GraphPad Prism.

Статистический анализ

Все данные выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартная погрешность среднего (СПС). Разницу (дельта) объема опухоли и массы тела использовали для статистического анализа. Осуществляли сравнения между группами, используя Kruskal-Wallis ANOVA с последующим апостериорным критерием Данна или критерием Тьюки. Для всех статистических оценок, уровень значимости устанавливали при $p < 0,05$. Описывали достоверность по сравнению с контрольной группой с наполнителем, если специально не указано иначе.

Стандартные протоколы, используемые в фармакологических исследованиях, предварительно не проводили для демонстрации статистически достоверных преимуществ комбинаций по сравнению с соответствующих лечением агентами в виде монотерапий. Статистическая мощность часто ограничивается эффективностью ответа единичного средства и/или вариативностью модели. Тем не менее, представлены р-значения для комбинаций относительно лечения единичными средствами в виде монотерапий.

Результаты

Синергический противоопухолевый эффект комбинированного MCL1 и BCL-2 ингибирования

В 7844HAMLX5343-XEF исследовании, Соединение 1, ABT-199 или Соединение 3 отдельно не проявляют противоопухолевой активности на HAMLX5343 модели, несущей KRAS мутацию, при введении в дозе 50 мг/кг (перорально или вв), 25 мг/кг (перорально) или 12,5 мг/кг (вв) один раз в неделю, соответственно (%T/C 98, 92, 98 или 99%, соответственно $p > 0,05$).

При пероральном введении соединение 1 в дозе 50 мг/кг или ABT-199 в дозе 25 мг/кг в комбинации с соединением 3 (12,5 мг/кг вв) один раз в неделю приводит к опухолестазу (%T/C 3 или 6%, соответственно, $p < 0,05$) на этой модели. С другой стороны, комбинация внутривенно вводимого Соединения 1 с Соединением 3 индуцирует практически полную регрессию опухоли (% регрессии 100%), что достоверно отличается от любого единичного средства ($p < 0,05$) или комбинации Соединение 1/Соединение 3

по/вв. Среднюю опухолевую нагрузку для каждой леченной группы представляли графически в динамике во времени для периода лечения продолжительностью 18 дней, как представлено на фиг. 1. Изменение опухолевой нагрузки, %Т/С или % регрессии представлено в табл. 16 и на фиг. 16 (а)-(в).

Таблица 16. Обобщенные результаты противоопухолевого эффекта в 7844HAMLX5343-XEF исследовании

Лечение	Т/С %	Регрессия %
Наполнитель	100	
Соединение 1 50 мг/кг массы тела <i>по</i>	98	
Соединение 1 50 мг/кг массы тела <i>вв</i>	92	
АВТ-199 25 мг/кг массы тела <i>по</i>	98	
Соединение 3 12,5 мг/кг массы тела <i>вв</i>	99	
Соединение 1 + Соединение 3 (<i>по/вв</i>)	3*	
Соединение 1 + Соединение 3 (<i>вв/вв</i>)		100**
АВТ-199 + Соединение 3 (<i>по/вв</i>)	6*	

* $p < 0,05$ по сравнению с Наполнителями и отдельными агентами (ANOVA, критерий Тьюки)

** $p < 0,05$ по сравнению с *по/вв* комбинацией (ANOVA, критерий Тьюки)

Вывод

AML представляет собой агрессивное и гетерогенное злокачественное заболевание системы крови, вызываемое трансформацией гематологических клеток-предшественников вследствие приобретенных генетических перестроек (Patel и др., New England Journal of Medicine 2012 366: 1079-1089). 5-летний коэффициент выживаемости при AML является низким вследствие отсутствия эффективных терапий. Обход апоптоза является характерным отличительным признаком злокачественного новообразования (Hanahan и др., Cell 2000 100:57-70). Одним из первичных средств, с помощью которых раковые клетки избегают апоптоза, является повышенное регулирование способствующих выживанию белков семейства BCL-2, таких как BCL-2, BCL-xL и MCL1.

MCL1 ген является наиболее часто амплифицированным геном у пациентов со злокачественным новообразованием (Beroukhi и др., Nature 2010 463:899-905). Кроме того, оба BCL-2 и MCL1 высоко экспрессируются при AML. Следовательно, комбинация соединения 1 (BCL-2i) и соединения 3 (MCL1) может обеспечивать синергизм путем усиления проапоптотических сигналов в качестве основного механизма против AML.

В настоящей заявке нами было показано, что BCL-2 ингибитор соединения 1 или АВТ-199 в комбинации с соединением 3 (MCL1 ингибитор) имеют ярко выраженный синергетический эффект при лечении AML на AML модели ксенотрансплантата с KRAS мутацией (дт FLT3). Комбинация *вв/вв* соединения 1/соединение 3 имеет преимущества по сравнению с лечением *по/вв* комбинацией на одном и том же уровне дозирования. Полученные результаты указывают на то, что комбинация и MCL1 ингибиторов будет являться эффективной терапией для AML.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация для лечения злокачественного новообразования, содержащая:

(а) BCL-2 ингибитор, выбранный из

(i) N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием,

(ii) 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил} фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида или его соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием и

(iii) 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил} пиперазин-1-ил)-N-[(3-нитро-4-{[(оксан-4-ил)метил]амино} фенил)сульфонил]-2-[(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)окси]бензамида (АВТ-199); и

(б) MCL1 ингибитор, выбранный из

(iv) (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}-фенил)пропионовой кислоты или соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, и

(v) (2R)-2-{[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси} фенил)пропионовой кислоты или ее соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основании

ем, для одновременного, последовательного или раздельного применения.

2. Комбинация по п.1, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид.

3. Комбинация по п.1, где BCL-2 ингибитор представляет собой 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид.

4. Комбинация по п.2, где N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил}-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид представлен в форме гидрохлоридной соли.

5. Комбинация по п.3, где 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид представлен в форме гидрохлоридной соли.

6. Комбинация по п.1, где BCL-2 ингибитор представляет собой ABT-199.

7. Комбинация по п.1, где MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(3S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

8. Комбинация по п.1, где MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)-пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

9. Комбинация по п.1, где

BCL-2 ингибитор представляет собой 5-(5-хлор-2-{[(3S)-3-(морфолин-4-илметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил]карбонил}фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид и

MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

10. Комбинация по п.1, где

BCL-2 ингибитор представляет собой ABT-199 и

MCL1 ингибитор представляет собой (2R)-2-{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропионовую кислоту.

11. Комбинация по любому из пп.1-10, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей.

12. Применение комбинации по любому из пп.1-10 для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

13. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой лейкоз.

14. Применение по п.13, где лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз, T-ALL или B-ALL.

15. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой миелодиспластический синдром или миелопролиферативное заболевание.

16. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой лимфому.

17. Применение по п.16, где лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

18. Применение по п.17, где неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому или лимфому из клеток зоны мантии.

19. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

20. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой нейробластому.

21. Применение по п.12, где злокачественное новообразование представляет собой мелкоклеточный рак лёгкого.

22. Лекарственное средство, содержащее раздельно или совместно:

(а) BCL-2 ингибитор, как определено в п.1, и

(б) MCL1 ингибитор, как определено в п.1,

для одновременного, последовательного или раздельного введения, и где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор обеспечиваются в эффективных количествах для лечения злокачественного новообразования.

23. Применение терапевтически эффективного количества (а) BCL-2 ингибитора, как определено в п.1, и (б) MCL1 ингибитора, как определено в п.1, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

24. Применение синергетически эффективного количества (а) BCL-2 ингибитора, как определено в п.1, и (б) MCL1 ингибитора, как определено в п.1, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

25. Применение по п.24, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор обеспечиваются в синергетически

эффективных количествах, которые способны уменьшать дозу, необходимую для каждого соединения для лечения злокачественного новообразования, обеспечивая при этом эффективное лечение злокачественного новообразования, с уменьшением в конечном итоге побочных эффектов.

26. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[[[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид, причем BCL-2 ингибитор при осуществлении комбинированного лечения используется в дозе от 50 до 1500 мг.

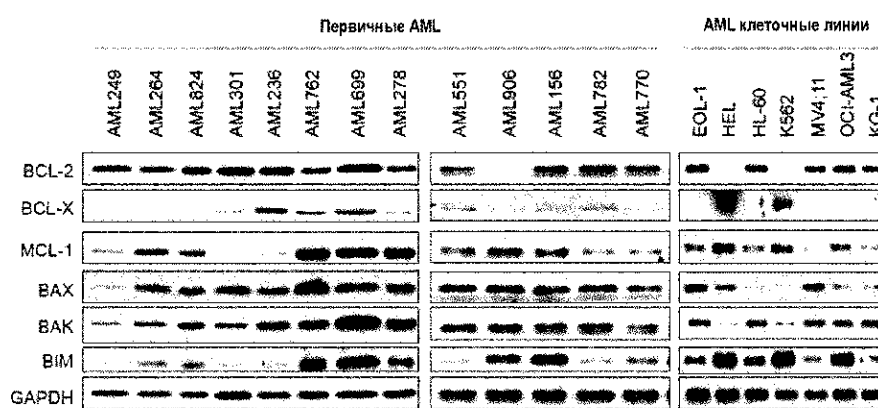
27. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор вводят один раз в неделю.

28. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор представляет собой N-(4-гидроксифенил)-3-{6-[[[(3S)-3-(4-морфолинилметил)-3,4-дигидро-2(1H)-изохинолинил]карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил}-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидро-1-индолизин карбоксамид, причем BCL-2 ингибитор при осуществлении комбинированного лечения вводят один раз сутки.

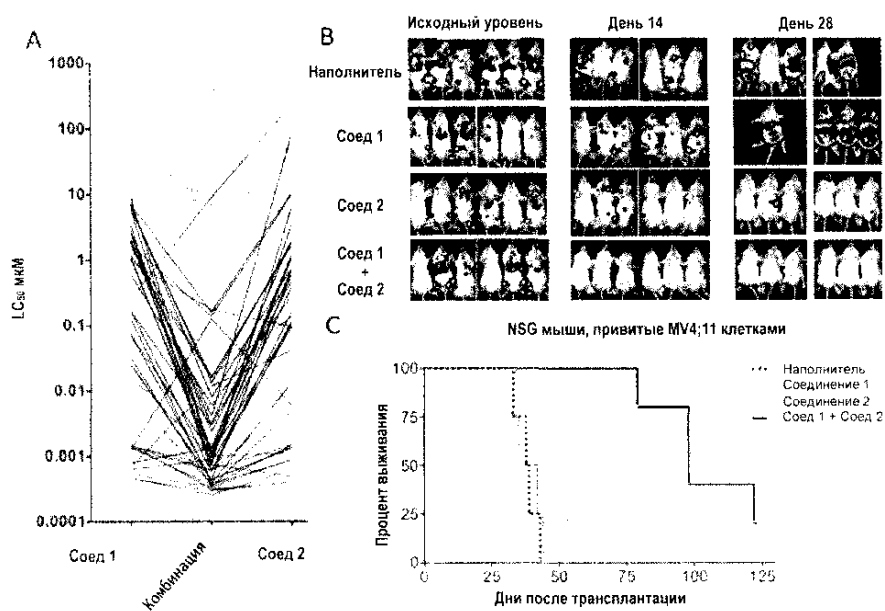
29. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор вводят перорально.

30. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор вводят перорально и MCL1 ингибитор вводят внутривенно.

31. Применение по п.23, где BCL-2 ингибитор и MCL1 ингибитор вводят внутривенно.

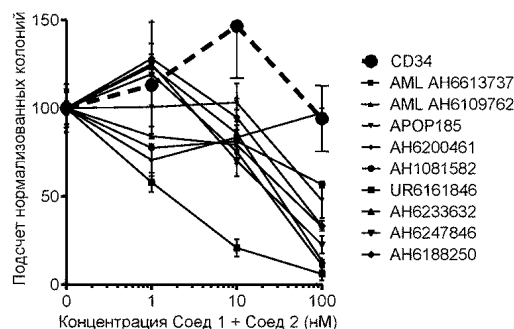


Фиг. 1. Экспрессия BCL-2 и MCL1 преобладает в AML. Анализ с помощью иммуноблоттинга показал экспрессию представителей BCL-2 семейства в образцах первичных AML и клеточных линий AML. BCL-2 и MCL1 белки доминантно экспрессировались в отличие от BCL-XL, который экспрессировался в меньшем количестве образцов первичных AML и клеточных линий AML.

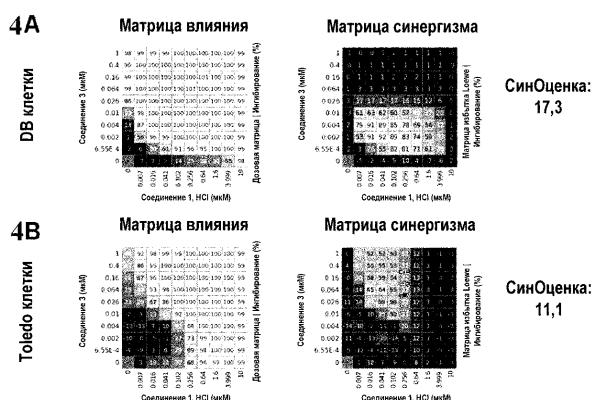


Фиг. 2. Комбинированное BCL-2/MCL1 нацеливание имеет синергическую активность в AML (A) Серию образцов первичных AML инкубировали с Соединением 1/Соед 1 (HCl соль) и Соединением 2/Соед 2 отдельно, или в комбинации и определяли LC_{50} уничтожающий эффект. Это показало существенный синергический эффект этой комбинации в большей части образцов первичных AML (B), группам 8 NSG мышей прививали люц-MV4;11 AML клетки и после подтвержденного прививания, мышей лечили

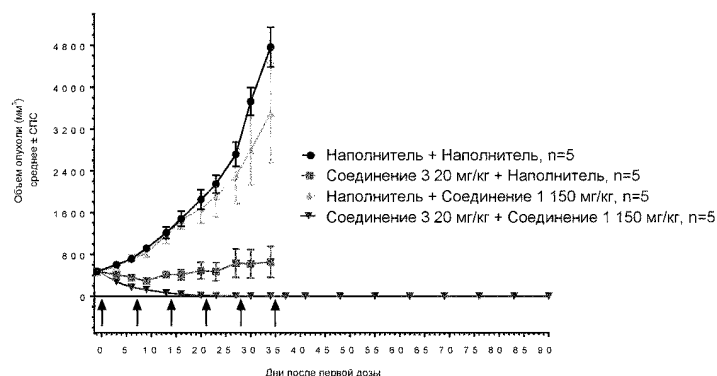
через 10 дней с применением соединения 1, HCl (100 мг/кг п/о по рабочим дням - дозировку представляли в виде свободного основания) или Соединения 2 (25 мг/кг в/в два раза в неделю) отдельно, или в комбинации в течение 4 последовательных недель. Введения только наполнителя одной группе служило в качестве контроля. При биовизуализации мышей в день 14 и 28 после прививания обнаружили заметную супрессию AML в группах, леченных Соединением 2 и Соединением 1 + Соединением 2, Тем не менее, в (С), выживание для мышей, леченных с применением Соединения 1 + Соединения 2, было существенно увеличенным, по сравнению с другими лечеными группами, что подтверждает клиническое преимущество двухкомпонентной BCL-2/NICL1 нацеленной терапии *in vivo*.



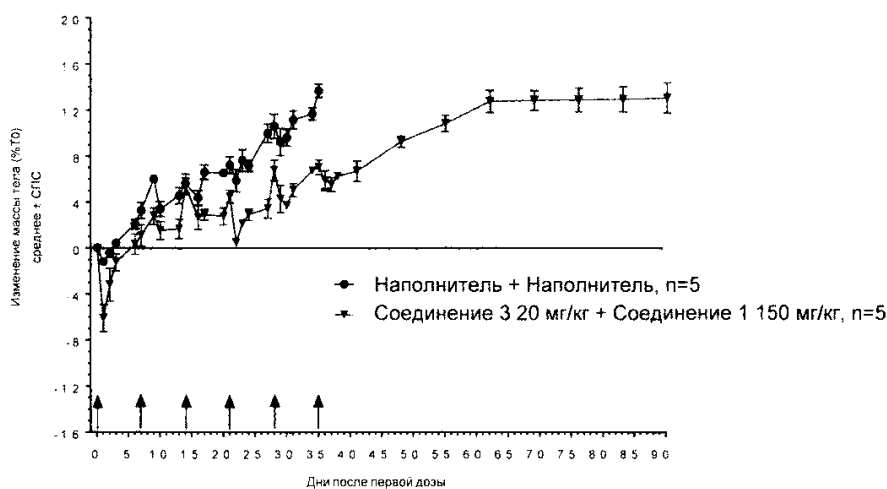
Фиг. 3. Определение токсичности BCL-2 нацеливания (с соединением 1/Соед 1; HCl соль) в комбинации с MCL1 нацеливанием (с соединением 2/Соед 2), на клонотическое функционирование нормальных CD34+ клеток от здоровых доноров или лейкемических бластных клеток от пациентов с AML. Лекарственные средства в указанных концентрациях инкубировали с клетками и подсчитывали колонии через 14-21 дней, используя Gelcount® анализатор. Колонии нормализовали по отношению к ДМСО контролю. Соединение 1 в комбинации с соединением 2 подавляет AML колониеобразующую активность без воздействия на функцию нормального роста CD34+ колоний.



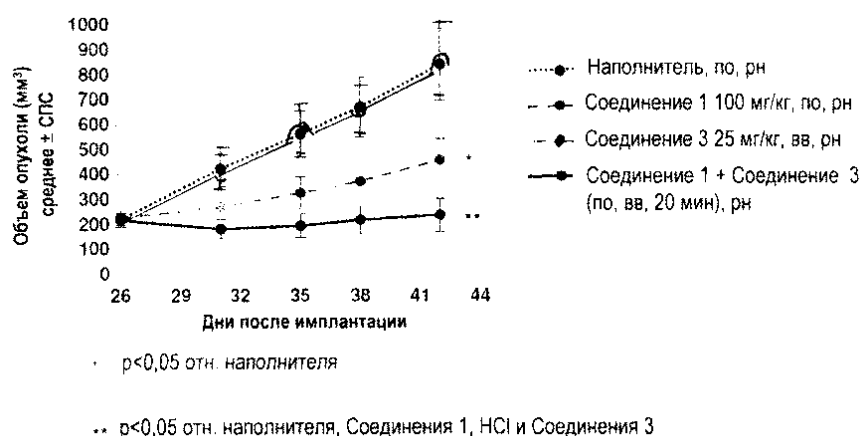
Фиг. 4. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 в комбинации с соединением 1, HCl в DB клетках (A) и Toledo клетках (B).



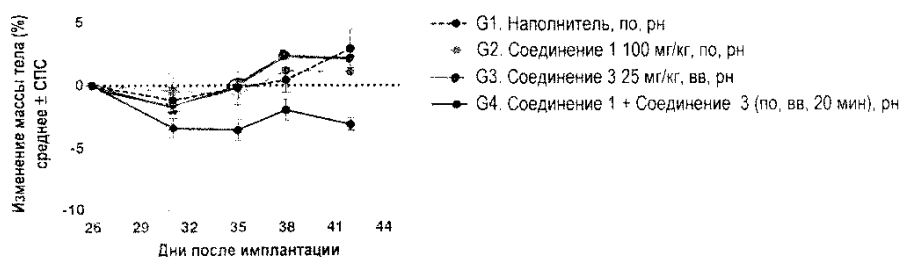
Фиг. 5. Противоопухолевые эффекты Соединения 1, HCl, Соединения 3 и комбинации Соединение 1, HCl + Соединение 3 на модели ксенотрансплантата Karpas422 у крыс.



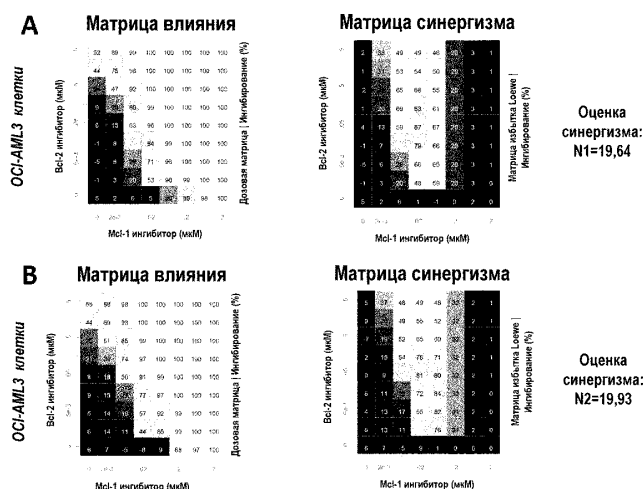
Фиг. 6. Изменения массы тела у животных, леченных с применением соединения 1, HCl, Соединения 3 и комбинации Соединение 1, HCl + Соединение 3 на модели ксенотрансплантата лимфомы Karpas422 у крыс.



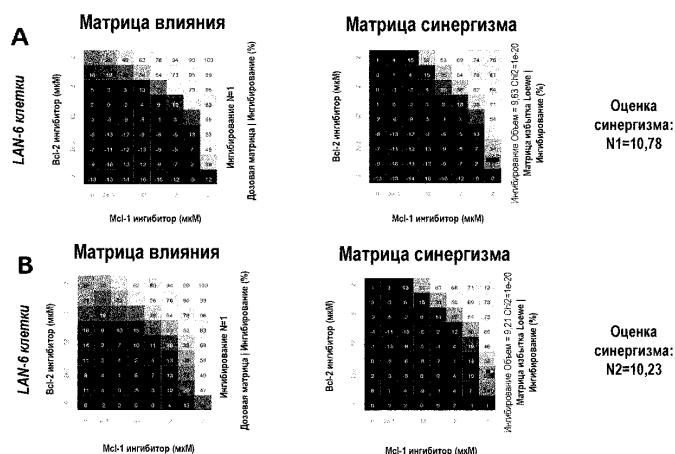
Фиг. 7. Противоопухолевые эффекты Соединения 1, HCl, Соединения 3 и комбинации Соединение 1, HCl + Соединение 3 на DLBCL Toledo модели ксенотрансплантата у мышей.



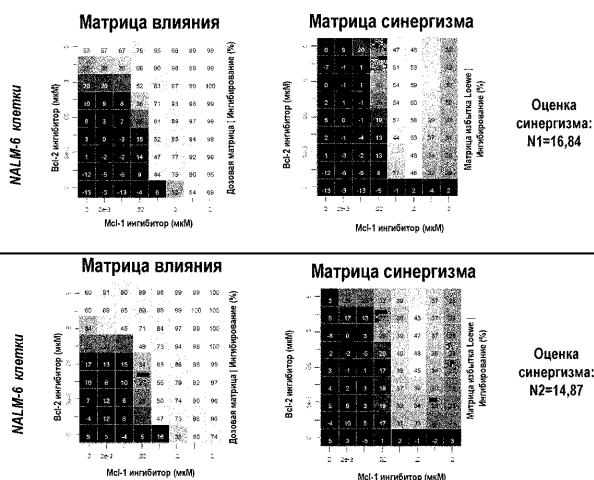
Фиг. 8. Изменения массы тела у животных, леченных с применением соединения 1, HCl, Соединения 3 и комбинации Соединение 1, HCl + Соединение 3 на модели ксенотрансплантата DLBCL Toledo у мышей



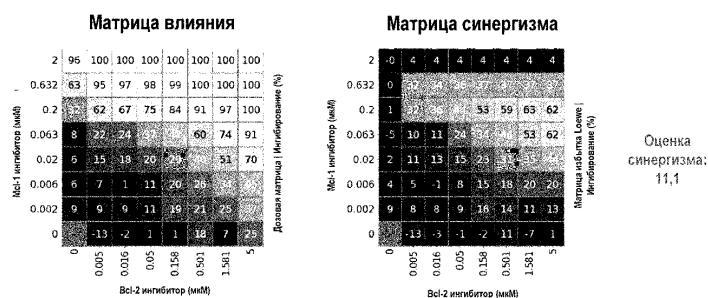
Фиг. 9. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в AML клеточной линии OCI-AML3 в двух независимых экспериментах.



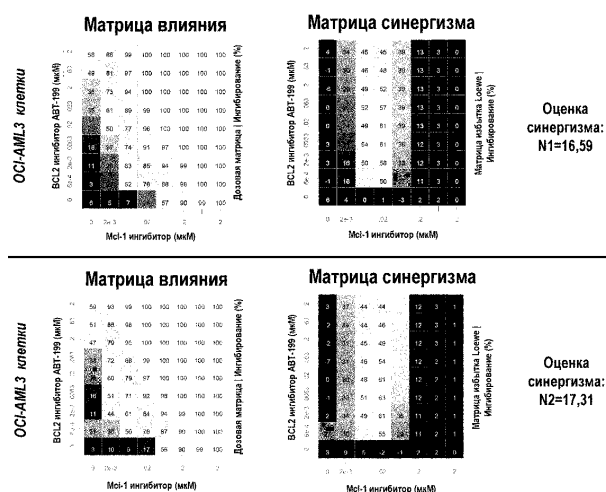
Фиг. 10. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в NB клеточной линии LAN-6 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель).



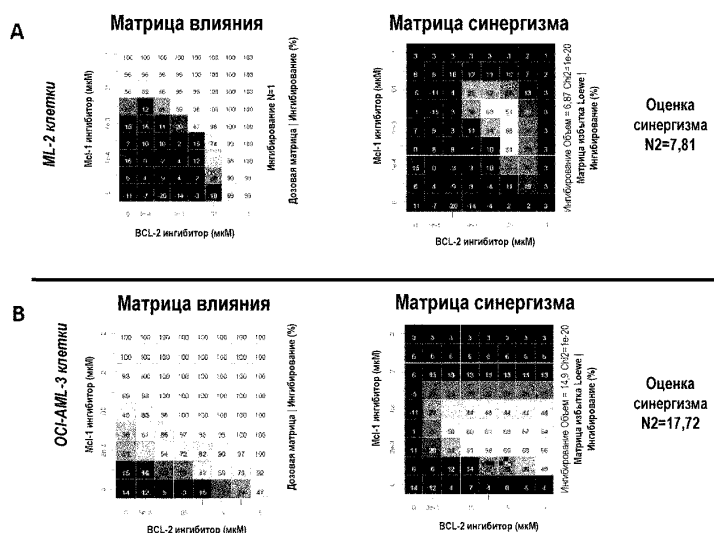
Фиг. 11. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в B-ALL клеточной линии NALM-6 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель).



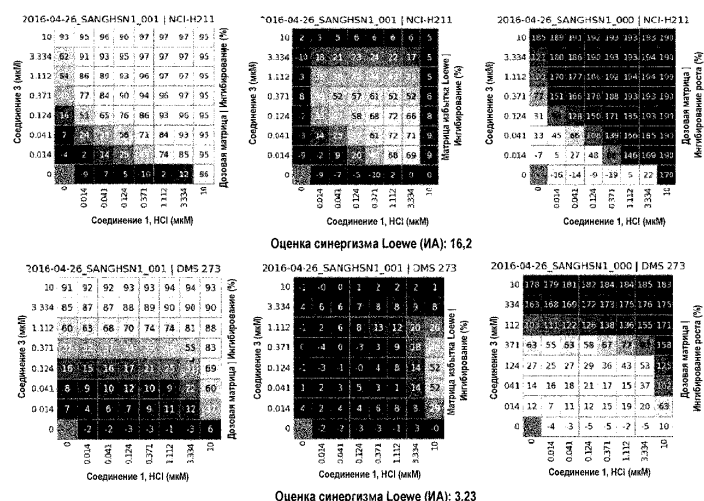
Фиг. 12. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в MCL клеточной линии Z-138.



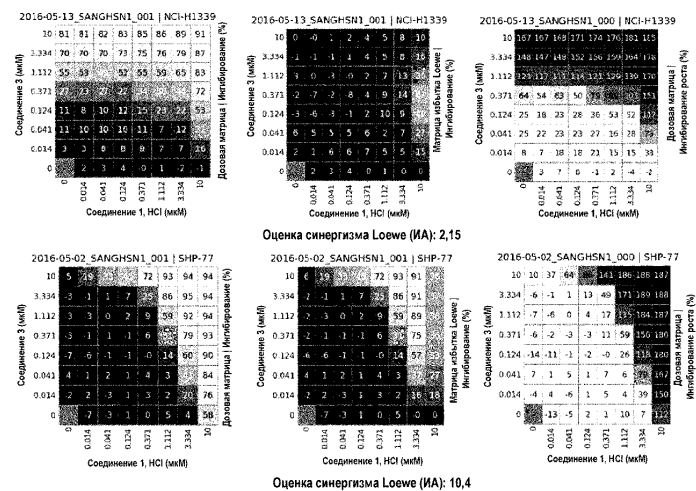
Фиг. 13. Матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с ABT-199 (BCL-2 ингибитор) в AML клеточной линии OCI-AML3 в двух независимых экспериментах (N1: верхняя панель; N2: нижняя панель)



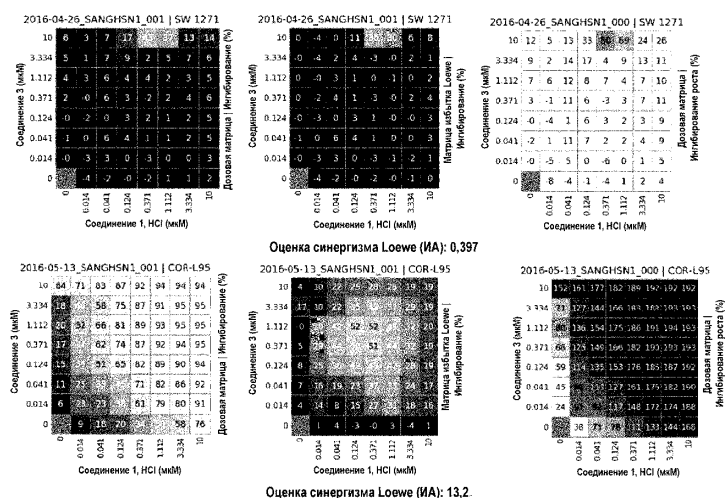
Фиг. 14. Типичные матрицы ингибирующего влияния на рост клеток и синергизма комбинации для ингибирования роста клеток (слева) и ингибирования избытка Loewe (справа), обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) в AML клеточных линиях (ML-2 клетки в А и OCI-AML-3 в В).



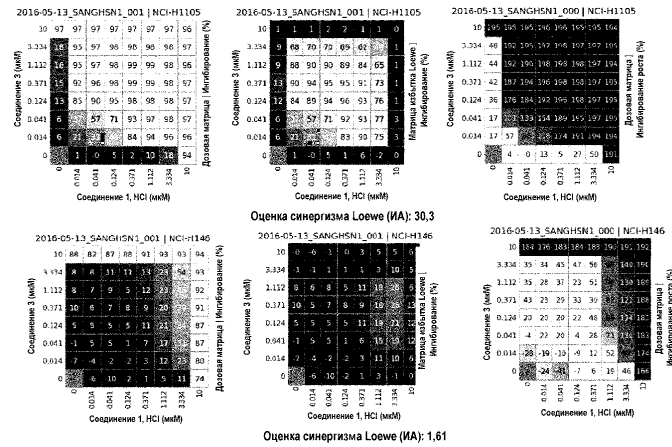
Фиг. 15(a): Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) на панели SCLC клеточных линий.



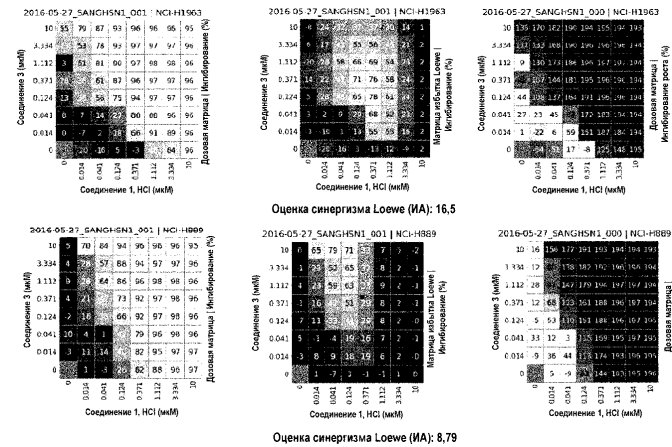
Фиг. 15(b): Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) на панели SCLC клеточных линий.



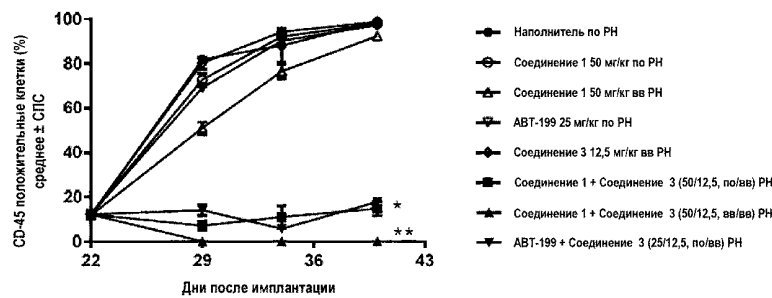
Фиг. 15(c): Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) на панели SCLC клеточных линий.



Фиг. 15(d): Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) на панели SCLC клеточных линий.



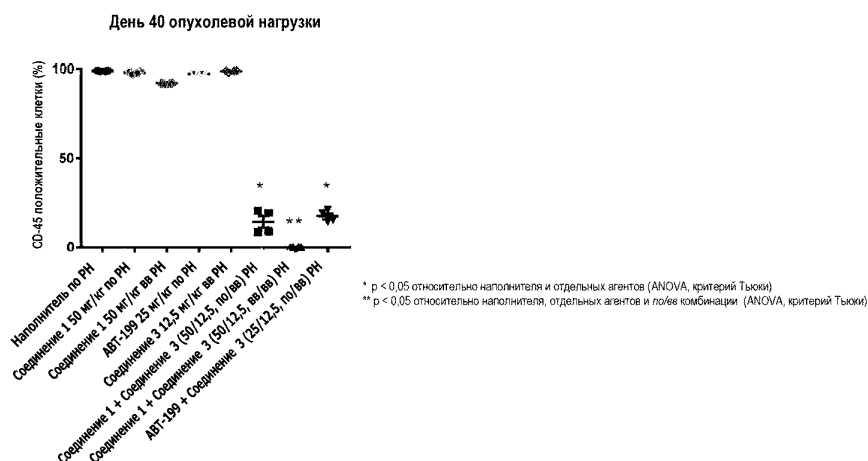
Фиг. 15(e): Дозовые матрицы для ингибирования (слева), ингибирования избытка Loewe (посередине) и ингибирования роста, обеспечиваемые Соединением 3 (MCL1 ингибитор) в комбинации с соединением 1, HCl (BCL-2 ингибитор) на панели SCLC клеточных линий.



* $p < 0,05$ относительно наполнителя и отдельных агентов (ANOVA, критерий Тьюки)

** $p < 0,05$ относительно наполнителя, отдельных агентов и по/вв комбинации (ANOVA, критерий Тьюки)

Фиг. 16(a). Противоопухолевые эффекты Соединения 1, HCl, АВТ-199, Соединения 3 и комбинации Соединения 1, HCl или АВТ-199 + Соединение 3 на полученной от пациентов первичной AML модели HAMLX5343 у мышей.



Фиг. 16(b). Противоопухолевые эффекты Соединения 1, HCl, АВТ-199, Соединения 3 и комбинации Соединения 1, HCl или АВТ-199 + Соединения 3 на полученной от пациентов первичной AML модели HAMLX5343 у мышей.

Идентификационный номер AML	AML94	AML114	AML128	AML118	AML131	AML112	AML96	AML100	AML95	AML132	AML119	AML117	AML59	AML40	AML98	AML91	AML109	AML110
Идарубин																		
Соединение 1, HCl		0.214	0.131			0.362	0.009	0.156	0.177	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
АВТ-199			0.108		0.257	0.114	0.096	0.07	0.139	>10	>10	>10	>10	0.768	>10	>10	0.403	>10
Соединение 2	0.250		0.062	0.578	0.219	0.148	0.148	0.148	0.148	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Соед 1, HCl+Соед 2										>10	>10	>10	>10	0.232	>10	>10	>10	>10
АВТ-199+Соед 2										>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Жизнеспособность в ДМСО (%)	76	92	82	99	91	71	80	78	86	83	85	75	96	87	77	77	79	96

Фиг. 17. Сравнение теплокарты AML чувствительности (LC_{50}) к ВНЗ-миметической монотерапии, или комбинациям лекарственных средств (тестируемых при соотношении 1:1), относительно химиотерапии (идарубин) после воздействия в течение 48 ч. Представлена жизнеспособность клеток каждого образца первичных AML через 48 ч в ДМСО.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2