

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192598 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.18(22) Дата подачи заявки
2020.03.25

(51) Int. Cl. A61K 31/44 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/255 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/7008 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(31) 2019-057029

(32) 2019.03.25

(33) JP

(86) PCT/JP2020/013454

(87) WO 2020/196665 2020.10.01

(71) Заявитель:

ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,
ЛТД. (JP)

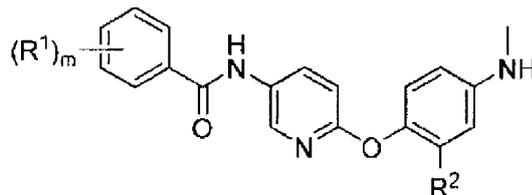
(72) Изобретатель:

Охи Наото, Окуно Мицухиро, Танака
Хидео (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Задачей является предоставление новой комбинации противоопухолевых средств, которая может значительно уменьшать размер опухолей посредством синергического противоопухолевого действия без усиления побочных эффектов настолько, насколько это возможно. Предусматривается противоопухолевая композиция, содержащая следующее соединение (B) или его соль, для применения в комбинации со следующим противоопухолевым средством (A): (A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ; (B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов; R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и m обозначает целое число от 1 до 3 при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

A1

202192598

202192598

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 570286EA/55

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ КОМПОЗИЦИЯ

[Область техники]

[0001]

Настоящее изобретение относится к противоопухолевой композиции, к способу предупреждения или лечения опухоли и т.п. Полное содержание всех документов, цитированных в настоящем описании, включая приведенные ниже документы уровня техники (патентные документы и непатентные документы), включено в настоящее описание в качестве ссылок.

[Уровень техники]

[0002]

Число людей, умирающих от злокачественных опухолей (рака) растет. Таким образом, всегда являются желательными улучшенные способы лечения злокачественных опухолей, и такие способы разрабатываются каждый день.

[Список литературы]

[Патентные документы]

[0003]

[PTL 1]

WO2012/046825

[Сущность изобретения]

[Техническая проблема]

[0004]

Как правило, когда противоопухолевое средство вводят отдельно при химиотерапии опухолей, в частности, злокачественных опухолей, для проявления достаточных противоопухолевых эффектов существуют ограничения с точки зрения побочных эффектов и т.д. Таким образом, в клинических условиях проводится комбинированная терапия несколькими лекарственными средствами, сочетающая в себе два, или три, или более лекарственных средств. Целью этой комбинированной терапии является снижение побочных эффектов или усиление противоопухолевого действия путем комбинирования различных противоопухолевых средств, например, 1) для уменьшения популяций нечувствительных клеток, 2) для предупреждения или отсрочивания возникновения резистентности к лекарственным средствам, и 3) для рассредоточения токсичности путем комбинирования лекарственных средств с различными профилями токсичности.

[0005]

Однако даже если комбинированную терапию проводят путем комбинирования случайным образом различных противоопухолевых средств, эффект усиления противоопухолевого действия не всегда может быть достигнут. Кроме того, когда используется несколько противоопухолевых средств в комбинации, побочные эффекты

часто возрастают вместе с противоопухолевым действием. По этой причине существует потребность в новой комбинации противоопухолевых средств, которые могут значительно уменьшать опухоли посредством синергического противоопухолевого действия без повышения побочных эффектов настолько, насколько это возможно.

[Решение проблемы]

[0006]

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинированное применение определенного противоопухолевого средства и определенного соединения позволяет достигнуть значительно более высокого противоопухолевого эффекта, чем противоопухолевые эффекты, достигаемые с использованием их по отдельности, и осуществили дальнейшее усовершенствование.

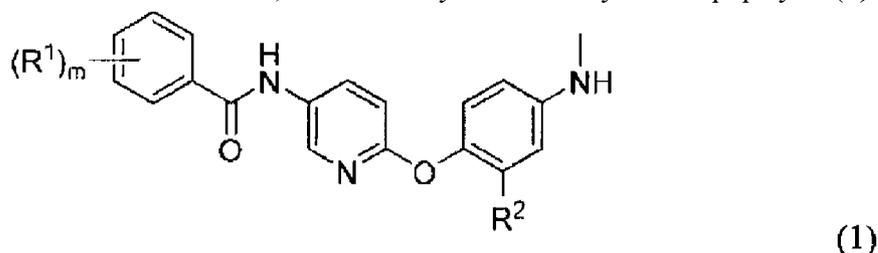
[0007]

Настоящее изобретение охватывает, например, объект, описанный в следующих положениях.

Пункт 1. Противоопухолевая композиция, содержащая следующее соединение (B) или его соль для применения в комбинации со следующим противоопухолевым средством (A):

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующее следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

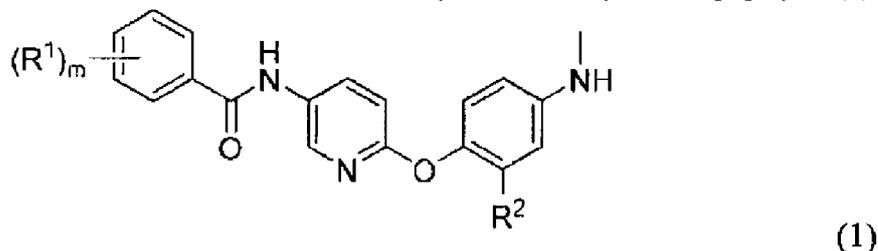
m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

Пункт 2. Противоопухолевая композиция, содержащая следующее соединение (B) или его соль для применения для введения индивидууму, которому будут вводить или вводят следующее противоопухолевое средство (A):

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы,

состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

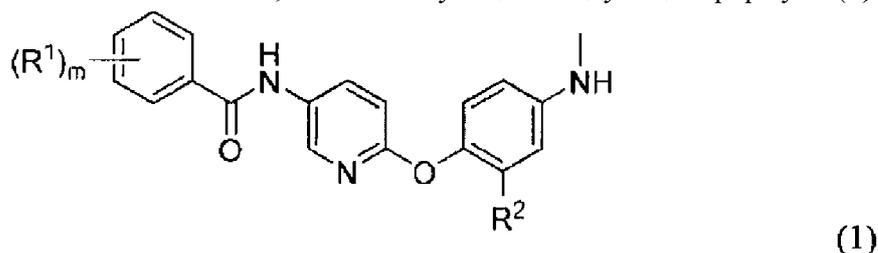
Пункт 3. Противоопухолевая композиция, содержащая:

следующее противоопухолевое средство (A), и

следующее соединение (B) или его соль:

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

Пункт 4. Композиция согласно любому из пунктов 1-3, где соединение (B) или его

соль представляют собой по меньшей мере одно соединение или его соль, выбранные из группы, состоящей из:

- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2-фтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2,3,4-трифтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2-фтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- 2-фтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,
- 2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,
- N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2-фтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида

и

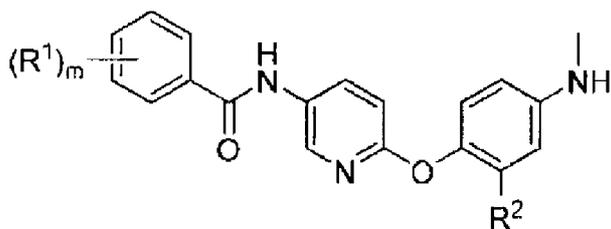
2,3,4-трифтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида.

Пункт 5. Набор, содержащий:

следующее противоопухолевое средство (А), и
 противоопухолевую композицию, содержащую следующее соединение (В) или его соль:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(В) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

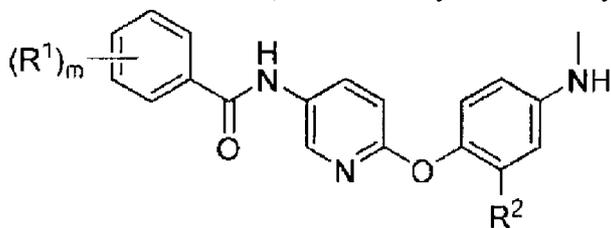
R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

Пункт 6. Способ предупреждения или лечения опухоли, причем способ включает введение следующего противоопухолевого средства (А) и следующего соединения (В) или его соли индивидууму:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(В) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

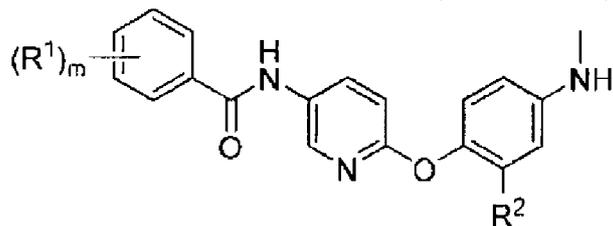
m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

Положение 7. Следующее соединение (В) или его соль для применения в комбинации со следующим противоопухолевым средством (А) для предупреждения или лечения опухоли:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов

метилования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

Пункт 8. Композиция согласно любому из пунктов 1-4, набор согласно пункту 5, способ предупреждения или лечения согласно пункту 6, или соединение или его соль согласно пункту 7, где противоопухолевое средство (A) является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из:

соединений, имеющих 2 или 3, или более алкильных групп, способных ковалентно связываться с основаниями ДНК,

антител против CD20 или их фрагментов, которые распознают антиген CD20, аптамеров, которые распознают антиген CD20, или комплексных молекул, содержащих их (предпочтительно, конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC)),

ингибиторов ДНК-метилтрансферазы,

антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ.

Пункт 9. Композиция согласно любому из пунктов 1-4, набор согласно пункту 5, способ предупреждения или лечения согласно пункту 6, или соединение или его соль согласно пункту 7, где противоопухолевое средство (A) является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из:

азотистых ипритов (например, мехлорэтамид гидрохлорид, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил и бендамустин), азиридинов и эпоксидов (например, тиотепа, митомицин С и диангидрогалактит), алкилсульфонатов (например, бусульфан), нитрозомочевин (например, кармустин, ломустин и ранимустин), гидразина и производных триазена (например, прокарбазин, дакарбазин и темозоломид),

ритуксимаба, ибритумомаба, антител, для которых подтверждено, что они сравнимы с ритуксимабом или ибритумомабом (биоаналоги ритуксимаба или

ибритумомаба), ибритутомаба тиуксетана, децитабина, азацитидина и зебуларина, цитарабина, 5-FU (5-фторурацил), азатиоприна, меркаптопурина и метотрексата, венетоклакса, и лапатиниба, гефитиниба, иматиниба, понатиниба, эрлотиниба, ибрутиниба, акситиниба, ленватиниба, афатиниба и гилтеритиниба.

[Преимущественные эффекты изобретения]

[0008]

Комбинированное применение конкретного противоопухолевого средства и конкретного соединения позволяет достигнуть противоопухолевого эффекта, значительного превышающего противоопухолевые эффекты, достигаемые при их использовании по отдельности.

[Краткое описание чертежей]

[0009]

[Фиг.1]

На фиг.1 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект N-{6-[2-метил-4-(метиламино)феноксипиридин-3-ил]-4-(трифторметил)бензамида гидрохлорида (далее также называемого "соединением А" в кратком описании чертежей) и бендамустина на клеточную линию фолликулярной лимфомы человека ДОНН-2.

[Фиг.2]

На фиг.2 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-231.

[Фиг.3]

На фиг.3 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека СМК-86.

[Фиг.4]

На фиг.4 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и бусульфана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.5]

На фиг.5 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (СML) человека K562.

[Фиг.6]

На фиг.6 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и тиотепы на клеточную линию рака легкого человека A549.

[Фиг.7]

На фиг.7 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию рака поджелудочной железы человека ВхРС-3.

[Фиг.8]

На фиг.8 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека КG-1.

[Фиг.9]

На фиг.9 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) человека U2932.

[Фиг.10]

На фиг.10 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) человека U2932.

[Фиг.11]

На фиг.11 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.12]

На фиг.12 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию рака желудка человека MKN45.

[Фиг.13]

На фиг.13 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.14]

На фиг.14 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека OCI-AML2.

[Фиг.15]

На фиг.15 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и цитарабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.16]

На фиг.16 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию рака молочной железы человека BT-474.

[Фиг.17]

На фиг.17 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию множественной миеломы человека RPMI 8226.

[Фиг.18]

На фиг.18 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и венетоклакса на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1.

[Фиг.19]

На фиг.19 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ранимустина на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (CML) человека K562.

[Фиг.20]

На фиг.20 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и тиотепы на клеточную линию рака яичника человека SK-OV-3.

[Фиг.21]

На фиг.21 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ибрутниба на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.22]

На фиг.22 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию миелодиспластического синдрома человека SKM-1.

[Фиг.23]

На фиг.23 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и эрлотиниба на клеточную линию рака легкого человека A549.

[Фиг.24]

На фиг.24 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и гефитиниба на клеточную линию рака легкого человека A549.

[Фиг.25]

На фиг.25 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и гефитиниба на клеточную линию рака легкого человека HCC 827.

[Фиг.26]

На фиг.26 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и иматиниба на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (CML) человека K562.

[Фиг.27]

На фиг.27 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и акситиниба на клеточную линию рака почки человека ACHN.

[Фиг.28]

На фиг.28 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-453.

[Фиг.29]

На фиг.29 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и ленватиниба на клеточную линию гепатомы человека Нер G2.

[Фиг.30]

На фиг.30 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека SK-BR-3.

[Фиг.31]

На фиг.31 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и афатиниба на клеточную линию рака легкого человека A549.

[Фиг.32]

На фиг.32 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и гилтеритиниба на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11.

[Фиг.33]

На фиг.33 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и 5-FU на клеточную линию рака головы и шеи (глотки) человека FaDu.

[Фиг.34]

На фиг.34 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и винкристина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly18.

[Фиг.35]

На фиг.35 представлены результаты анализа изоболограмм, демонстрирующие комбинированный эффект соединения А и доцетаксела на клеточную линию рака молочной железы человека BT-474.

[Фиг.36]

На фиг.36 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и циклофосамида на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.37]

На фиг.37 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и циклофосамида на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.38]

На фиг.38 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и циклофосамида на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.39]

На фиг.39 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-453.

[Фиг.40]

На фиг.40 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-453.

[Фиг.41]

На фиг.41 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и бендамустина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.42]

На фиг.42 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и ритуксимаба на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.43]

На фиг.43 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1.

[Фиг.44]

На фиг.44 представлены результаты комбинированного эффекта соединения А и цитарабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1.

[Фиг.45]

На фиг.45 представлены результаты комбинированного эффекта трех лекарственных средств: соединения А, бендамустина и ритуксимаба, на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7.

[Фиг.46]

Фиг.46 представлены результаты комбинированного эффекта трех лекарственных средств: соединения А, децитабина и венетоклакса, на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1.

[Описание вариантов осуществления]

[0010]

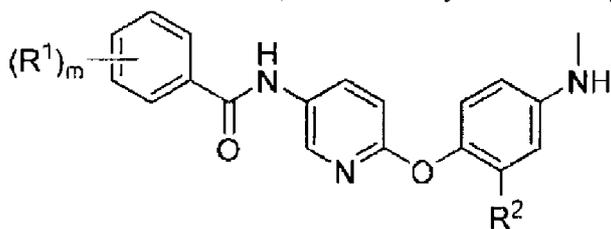
Каждый из вариантов изобретения, включенных в настоящее описание, более подробно описан ниже. Настоящее изобретение предпочтительно включает

противоопухолевую композицию, способ предупреждения или лечения опухоли, противоопухолевый набор и т.д.; однако настоящее изобретение не ограничивается ими. Настоящее изобретение охватывает все из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании и известных специалистам в данной области.

[0011]

Противоопухолевая композиция, охватываемая настоящим изобретением, включает следующее соединение (B) или его соль. Далее противоопухолевая композиция, содержащая соединение (B) или его соль, также называется "противоопухолевой композицией по настоящему изобретению".

(B) Соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

[0012]

Конкретные примеры индивидуальных групп, представленных в формуле (1), являются следующими.

[0013]

Примеры низших алкоксигрупп включают линейные или разветвленные алкоксигруппы, имеющие от 1 до 6 атомов углерода, такие как группы метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, трет-бутокси, пентилокси и гексилокси.

[0014]

Примеры низших алкильных групп включают линейные или разветвленные алкильные группы, имеющие от 1 до 6 атомов углерода, такие как метильная, этильная, пропильная, изопропильная, 2,2-диметилпропильная, 1-этилпропильная, бутильная, изобутильная, трет-бутильная, изопентильная, пентильная и гексильная группы.

[0015]

Примеры низших алкильных групп, необязательно замещенных одним или несколькими атомами галогена, включают, в дополнение к низшим алкильным группам, упомянутым выше, линейные или разветвленные алкильные группы, имеющие от 1 до 6

атомов углерода, которые могут быть замещены 1-3 атомами галогена, такие как трифторметильная, трихлорметильная, хлорметильная, бромметильная, фторметильная, йодметильная, дифторметильная, дибромметильная, дихлорметильная, 2-хлорэтильная, 2,2,2-трифторэтильная, 2,2,2-трихлорэтильная, 3-хлорпропильная, 2,3-дихлорпропильная, 4,4,4-трихлорбутильная, 4-фторбутильная, 5-хлорпентильная, 3-хлор-2-метилпропильная, 5-бромгексильная и 5,6-дибромгексильная группы.

[0016]

Примеры атомов галогена включают атомы фтора, хлора, брома и йода.

[0017]

Примеры арильных групп включают C_6 - C_{10} ароматические группы, такие как фенильная, 1-нафтильная, 2-нафтильная, о-толильная, м-толильная и п-толильная группы.

[0018]

Примеры арилоксигрупп включают C_6 - C_{10} арилоксигруппы, такие как группы фенокси, 1-нафтилокси и 2-нафтилокси.

[0019]

Предпочтительным примером является соединение или его соль, соответствующие формуле (1), где:

R^1 обозначает арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогена;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число, равное 1.

[0020]

Другим предпочтительным примером является соединение или его соль, соответствующие формуле (1), где:

R^1 обозначает атом галогена;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3;

при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

[0021]

Следующим предпочтительным примером является соединение или его соль, соответствующие формуле (1), где:

R^1 обозначает галоген или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогена;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число, равное 2;

при условии, что R^1 являются одинаковыми или различаются.

[0022]

Более конкретные предпочтительные примеры соединения, соответствующего формуле (1), включают:

N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксibenзамид,

N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамид,

2-фтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамид,

2,3,4-трифтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамид,

N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксibenзамид,

N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамид,

2-фтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамид,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксibenзамид,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамид,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксibenзамид,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

2-фтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамид,

2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамид,

2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамид,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамид,

2-фтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамид, и

2,3,4-трифтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамид.

[0023]

Также предпочтительно можно использовать соли этих соединений.

[0024]

Примеры соли соединения, соответствующего формуле (1), включают соли неорганических кислот, такие как сульфат, нитрат, гидрохлорид, фосфат и гидробромид; и соли органических кислот, такие как ацетат, сульфонат (например, п-толуолсульфонат, метансульфонат и этансульфонат), оксалат, малеат, фумарат, малат, тартрат, цитрат, сукцинат и бензоат.

[0025]

Соединение или его соль, соответствующие формуле (1), можно получать известным способом или способом, который может быть без труда установлен из известного способа. Например, для получения можно использовать способ, описанный в PTL 1 (WO2012/046825).

[0026]

Противоопухолевую композицию по настоящему изобретению используют в комбинации со следующим противоопухолевым средством (А):

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ.

[0027]

Алкилирующие средства представляют собой тип цитотоксических лекарственных средств против злокачественной опухоли (карциностатические лекарственные средства). Они имеют множество алкильных частей, способных ковалентно связываться с основаниями ДНК и препятствовать репликации ДНК путем связывания двух цепей ДНК (межцепочечное сшивание). Основания ДНК, в частности, гуанин, являются нуклеофильными. Как правило, основание ДНК и алкильная группа ковалентно связываются посредством реакции нуклеофильного замещения. Алкилирующее средство предпочтительно представляет собой средство, имеющее две или три, или более алкильных групп. Более конкретные примеры включают азотистые иприты (например, мехлорэтамид гидрохлорид, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил и бендамустин), азиридины и эпоксиды (например, тиотепа, митомицин С и диангидрогалактит), алкилсульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевину (например, кармустин, ломустин и ранимустин), гидразин и производные триазена (например, прокарбазин, дакарбазин и темозоломид), и т.п.

[0028]

Распознающие CD20 молекулы, упоминаемые в настоящем описании, представляют собой молекулы, которые распознают антиген CD20 (Vp35) и которые имеют противоопухолевый эффект. Примеры включают антитела против CD20 или их фрагменты, которые распознают антиген CD20, аптамеры, которые распознают антиген CD20, и комплексные молекулы, содержащие их. Антитела могут представлять собой либо поликлональные антитела, либо моноклональные антитела; однако предпочтительными являются моноклональные антитела. Кроме того, предпочтительные антитела представляют собой химерные антитела (химеры грызуна (например, мыши, крысы и китайского хомячка) и человека), гуманизированные антитела и полностью гуманизированные антитела. Предпочтительные примеры антител против CD20 включают ритуксимаб, ибритумомаб, антитела, для которых подтверждено, что они сравнимы с ритуксимабом или ибритумомабом (биоаналоги ритуксимаба или ибритумомаба) и т.п. Кроме того, конкретные примеры комплексных молекул, упоминаемых в настоящем описании, предпочтительно включают конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Конъюгат антитело-лекарственное средство предпочтительно представляет собой конъюгат, в котором антитело связано со средством против злокачественной опухоли через линкер. Примеры конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) включают

ибригитомаб тиуксетан, в котором антитело связано с соединением, содержащим радиоизотоп (тиуксетан).

[0029]

Ингибитор метилирования ДНК предпочтительно представляет собой ингибитор ДНК-метилтрансферазы. Более конкретные примеры включают децитабин, азацитидин, зебуларин и т.п.

[0030]

Антиметаболит предпочтительно представляет собой антиметаболит пиримидина, антиметаболит пурина или антифолат. Более конкретно, примеры антиметаболитов пиримидинов включают цитарабин и 5-FU (5-фторурацил); примеры антиметаболитов пуринов включают азатиоприн и меркаптопурин; и примеры антифолатов включают метотрексат.

[0031]

Bcl-2 (белок В-клеточной лимфомы 2) известен в качестве онкогена, который регулирует апоптоз посредством регуляции проницаемости митохондриальной мембраны. Примеры ингибиторов Bcl-2 включают венетоклакс.

[0032]

Примеры ингибиторов тирозинкиназ включают лапатиниб, гефитиниб, иматиниб, понатиниб, эрлотиниб, ибрутиниб, акситиниб, ленватиниб, афатиниб, гилтеритиниб и т.п.

[0033]

Противоопухолевая композиция по настоящему изобретению может быть получена путем комбинирования соединения (В) или его соли, например, с фармацевтически приемлемым носителем. Получение можно проводить известным способом, или способом, который может быть без труда установлен из известного способа.

[0034]

Противоопухолевую композицию по настоящему изобретению предпочтительно используют в форме фармацевтического препарата. Такие фармацевтические препараты получают путем составления с использованием обычно используемых эксципиентов или добавок, таких как наполнители, сухие разбавители, связующие вещества, смачивающие вещества, разрыхлители, поверхностно-активные вещества и смазывающие вещества.

[0035]

Форма фармацевтического препарата может быть выбрана из различных форм в зависимости от цели лечения. Типичные примеры включают таблетки, пилюли, порошки, растворы, суспензии, эмульсии, гранулы, капсулы, суппозитории, инъекционные формы (например, растворы и суспензии) и т.п.

[0036]

Для получения таблеток могут использоваться различные известные носители. Примеры носителей включают лактозу, сахарозу, хлорид натрия, глюкозу, мочевины, крахмал, карбонат кальция, каолин, кристаллическую целлюлозу и другие добавки; воду, этанол, пропанол, сахарный сироп, растворы глюкозы, растворы крахмала, растворы

желатина, карбоксиметилцеллюлозу, шеллак, метилцеллюлозу, фосфат калия, поливинилпирролидон и другие связующие вещества; сухой крахмал, альгинат натрия, порошковый агар, порошковый ламинаран, гидрокарбонат натрия, карбонат кальция, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтилена сорбитана, лаурилсульфат натрия, моноглицерид стеариновой кислоты, крахмал, лактозу и другие разрыхлители; сахарозу, стеарин, масло какао, гидрогенизированное масло и другие ингибиторы дезинтеграции; четвертичные основания аммония, лаурилсульфат натрия и другие усилители всасывания; глицерин, крахмал и другие смачивающие вещества; крахмал, лактозу, каолин, бентонит, коллоидную кремниевую кислоту и другие адсорбенты; очищенный тальк, стеарат, порошковую борную кислоту, полиэтиленгликоль и другие смазывающие вещества.

[0037]

Такие таблетки могут быть покрыты известными материалами покрытия, если необходимо, в случае, например, получения покрытых сахаром таблеток, покрытых желатином таблеток, покрытых кишечнорастворимым покрытием таблеток, покрытых пленкой таблеток, двухслойных или многослойных таблеток и т.п.

[0038]

Для получения пилюль могут использоваться различные известные носители. Примеры носителей включают глюкозу, лактозу, крахмал, масло какао, гидрогенизированное растительное масло, каолин, тальк и другие добавки; порошковый гуммиарабик, порошковый трагакант, желатин, этанол и другие связующие вещества; ламинаран, агар и другие разрыхлители.

[0039]

Для получения суппозиториев могут использоваться различные известные носители. Примеры носителей включают полиэтиленгликоль, масло какао, высшие спирты, сложные эфиры высших спиртов, желатин, полусинтетический глицерид и т.п.

[0040]

Для получения инъекционных форм, растворы, эмульсии или суспензии стерилизуют и предпочтительно доводят до изотоничности с кровью. Для получения растворов, эмульсий или суспензий могут использоваться различные известные и широко используемые эксципиенты. Примеры таких эксципиентов включают воду, этанол, пропиленгликоль, этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксилированный изостариловый спирт, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтилена сорбитана, и т.п. В этом случае, фармацевтический препарат может содержать хлорид натрия, глюкозу или глицерин в количестве, достаточном для получения изотонического раствора, и он может содержать распространенные солюбилизаторы, буферы, успокаивающие средства и т.п. Кроме того, фармацевтический препарат может при необходимости содержать красители, консерванты, вкусовые добавки, подсластители и/или другие лекарственные средства.

[0041]

Количество соединения (В) или его соли, содержащихся в противоопухолевой

композиции по настоящему изобретению, конкретно не ограничено, и в подходящем случае оно может быть выбрано из широкого диапазона. Например, количество соединения (B) или его соли в композиции составляет приблизительно от 0,1 до 70 масс.% и предпочтительно приблизительно от 0,1 до 30 масс.%.

[0042]

Путь введения противоопухолевой композиции по настоящему изобретению не ограничен. Например, противоопухолевую композицию можно вводить путем, пригодным для формы препарата, возраста и пола пациента, состояния заболевания и других условий. Например, таблетки, пилюли, растворы, суспензии, эмульсии, гранулы и капсулы вводят перорально. Инъекционные формы вводят отдельно или в смеси с распространенными веществами для инфузий, такими как растворы глюкозы и растворы аминокислот; или при необходимости вводят отдельно внутримышечно, внутривенным путем, подкожно или внутривенно. Суппозитории вводят ректально.

[0043]

Доза противоопухолевой композиции по настоящему изобретению может быть подходящим образом выбрана в соответствии со способом применения, возрастом и полом пациента, тяжестью заболевания, дозой и временем введения противоопухолевого средства (A) и другими условиями. Хотя она конкретно не ограничена, доза противоопухолевой композиции составляет, например, от 0,001 мг/кг массы тела/сутки до 100 мг/кг массы тела/сутки, и предпочтительно от 0,001 мг/кг массы тела/сутки до 50 мг/кг массы тела/сутки, в качестве однократной дозы или разделенных доз.

[0044]

Способ комбинации противоопухолевой композиции по настоящему изобретению и противоопухолевого средства (A) конкретно не ограничен. Более конкретно, например, противоопухолевая композиция по настоящему изобретению может представлять собой, например, (i) противоопухолевую композицию для применения в комбинации с противоопухолевым средством (A), (ii) противоопухолевую композицию, используемую для введения индивидууму, которому будут вводить или вводят противоопухолевое средство (A), или (iii) противоопухолевую композицию, дополнительно содержащую противоопухолевое средство (A).

[0045]

Противоопухолевая композиция (i) включает все из вариантов осуществления, в которых она используется в комбинации с противоопухолевым средством (A). Например, включен вариант осуществления, в котором противоопухолевая композиция (i) используется для введения индивидууму, которому будут вводить или вводят противоопухолевое средство (A). Иными словами, противоопухолевая композиция (i) включает противоопухолевую композицию (ii). Кроме того, например, противоопухолевая композиция (i) также включает вариант осуществления, в котором ее смешивают с противоопухолевым средством (A) для получения противоопухолевой композиции, содержащей не только соединение (B) или его соль, но также противоопухолевое средство

(А). Иными словами, противоопухолевая композиция (i) включает композицию для получения противоопухолевой композиции (iii). Кроме того, например, противоопухолевая композиция (i) также включает вариант осуществления, в котором она используется в качестве сборного набора с противоопухолевым средством (А). Иными словами, противоопухолевая композиция (i) включает вариант осуществления, в котором она используется вместе с противоопухолевым средством (А) для создания набора (в частности, противоопухолевый набор).

[0046]

Противоопухолевую композицию (ii) используют для введения индивидууму, которому будут вводить или вводят противоопухолевое средство (А). Индивидуум, которому будут вводить противоопухолевое средство (А) в этом случае представляет собой индивидуума, которому вводят противоопухолевое средство (А) после или одновременно с введением противоопухолевой композиции по настоящему изобретению. Кроме того, индивидуум, которому вводят противоопухолевое средство (А), в этом случае представляет собой индивидуума, которому вводят противоопухолевое средство (А) до введения противоопухолевой композиции по настоящему изобретению. В любом из этих случаев временной интервал между введением противоопухолевой композиции по настоящему изобретению и введением противоопухолевого средства (А) конкретно не ограничен при условии, что противоопухолевое средство (А) и противоопухолевую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации для обеспечения синергического эффекта для лечения опухоли. Например, может предусматриваться отсутствие временного интервала (т.е. одновременное введение), одно введение может начинаться в ходе другого введения, одно введение может начинаться сразу после завершения другого введения, одно введение может начинаться через от нескольких минут до нескольких десятков минут после завершения другого введения, или одно введение начинаться, например, приблизительно через 1-12 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) часов после завершения другого введения.

[0047]

Противоопухолевая композиция (iii) представляет собой противоопухолевую композицию, содержащую не только соединение (В) или его соль, но также противоопухолевое средство (А). Дозированная форма противоопухолевой композиции может быть подходящим образом выбрана с учетом дозированной формы противоопухолевого средства (А) и т.п. Например, она может быть получена путем смешения соединения (В) или его соли с противоопухолевым средством (А) или в ходе получения противоопухолевого средства (А). Таким образом, дозированная форма противоопухолевой композиции (iii) предпочтительно является такой же, как и дозированная форма противоопухолевого средства (А), используемого для получения.

[0048]

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему противоопухолевое средство (А) и противоопухолевую композицию, содержащую

соединение (B) или его соль. Набор также называют "набором по настоящему изобретению". Набор по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой противоопухолевый набор (т.е. набор для предупреждения или лечения опухоли). Кроме того, в дополнение к противоопухолевому средству (A) и противоопухолевой композиции, содержащей соединение (B) или его соль, набор в подходящем случае может включать лекарственное средство, более предпочтительно для предупреждения или лечения опухолей, устройство для введения (например, шприц), инструкции (прилагаемый документ) и т.п.

[0049]

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения или лечения опухоли, причем способ включает введение противоопухолевого средства (A) и соединения (B) или его соли индивидууму. Способ предупреждения или лечения также называют "способом предупреждения или лечения по настоящему изобретению". Способ предупреждения или лечения по настоящему изобретению включает способ предупреждения или лечения опухоли, включающий введение по отдельности противоопухолевого средства (A) и противоопухолевой композиции, содержащей соединение (B) или его соль, и способ предупреждения или лечения опухоли, включающий введение противоопухолевой композиции (iii). В предшествующем способе (способ предупреждения или лечения опухоли, включающий введение по отдельности), схема введения противоопухолевого средства (A) и противоопухолевой композиции, содержащей соединение (B) или его соль, конкретно не ограничена при условии, что противоопухолевое средство (A) и противоопухолевую композицию по настоящему изобретению вводят в комбинации для достижения синергического эффекта для лечения опухоли. Например, временной интервал не предусматривается (т.е. одновременное введение), одно введение может начинаться в ходе другого введения, одно введение может начинаться сразу после завершения другого введения, одно введение может начинаться через от нескольких минут до нескольких десятков минут после завершения другого введения, или одно введение может начинаться, например, приблизительно через 1-12 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) часов после завершения другого введения. Одно введение может быть до или после другого введения.

[0050]

Кроме того, субъект конкретно не ограничен при условии, что требуется лечение опухоли.

[0051]

В рамках настоящего изобретения опухоль представляет собой заболевание, вызванное аномальной клеточной пролиферацией, и предпочтительно представляет собой злокачественную опухоль (рак). Более конкретные примеры включают рак молочной железы (например, инвазивную протоковую карциному, протоковую карциному *in situ* и воспалительный рак молочной железы), рак предстательной железы (например, гормон-зависимый рак предстательной железы и гормон-независимый рак предстательной

железы), рак поджелудочной железы (например, рак протоков поджелудочной железы), рак желудка (например, папиллярная аденокарцинома, муцинозная аденокарцинома и железисто-плоскоклеточная карцинома), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого и злокачественная мезотелиома), рак толстого кишечника (например, желудочно-кишечная стромальная опухоль), рак прямой кишки (например, желудочно-кишечная стромальная опухоль), рак ободочной и прямой кишки (например, семейный рак ободочной и прямой кишки, наследственный неполипозный рак ободочной и прямой кишки и желудочно-кишечная стромальная опухоль), злокачественная опухоль тонкого кишечника (например, стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта), рак пищевода, рак двенадцатиперстной кишки, рак языка, фарингеальный рак (например, рак носоглотки, рак ротоглотки и гипофарингеальный рак), рак слюнных желез, опухоль головного мозга (например, пинеальная астроцитомы, пилоцитарная астроцитомы, диффузная астроцитомы и анапластическая астроцитомы), неврилеммому, рак печени (например, первичный рак печени и рак внепеченочных желчных протоков), рак почки (например, почечно-клеточный рак и переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника), рак желчных протоков, рак эндометрия, рак шейки матки, саркому матки, рак яичника (например, эпителиальный рак яичника, внегонадная герминома, опухоль зародышевых яичника и опухоль яичника низкоклеточного потенциала), рак мочевого пузыря, рак уретры, рак кожи (например, внутриглазная (глазная) меланома и карцинома из клеток Меркеля), гемангиому, злокачественную лимфому (например, неходжкинская лимфома и лимфома Ходжкина), злокачественную меланому, рак щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы), рак паращитовидной железы, рак носовой полости, рак околоносовых пазух, миелому (например, множественная миелома), опухоль кости (например, остеосаркома, опухоль Юинга и саркома мягких тканей), миелодиспластическую опухоль, миелопролиферативную опухоль, гемангиофибром, ретинальную саркому, рак полового члена, опухоль яичка, педиатрическую солидную злокачественную опухоль (например, опухоль Вильмса и педиатрическая опухоль почки), саркому Капоши, вызванную СПИДом саркому Капоши, опухоль верхнечелюстного синуса, фиброзную гистиоцитому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, лейкоз (например, острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и острый лимфобластный лейкоз) и т.п. Среди них, особенно предпочтительный тип злокачественной опухоли в качестве мишени, против которой применяют противоопухолевую композицию, набор или способ предупреждения или лечения по настоящему изобретению включает злокачественную лимфому, лейкоз, миелому, рак молочной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичника и т.п.

[0052]

В настоящем описании термин "содержащий" включает "по существу состоящий из" и "состоящий из".

[0053]

Различные характеристики (свойства, структуры, функции и т.д.), которые объяснены в описанных выше вариантах осуществления, можно комбинировать любым образом для определения объекта, охватываемого настоящим изобретением.

[Примеры]

[0054]

Объект, охватываемый настоящим изобретением, более подробно описан ниже. Однако объект не ограничивается следующими примерами.

[0055]

В соответствии со способом, описанным в примерах (в частности, в примере 24) WO2012/046825, получали гидрохлорид N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида (белый порошок). Гидрохлорид N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида также обозначается как соединение А ниже. Полученный белый порошок соединения А использовали как "нерасфасованный порошок соединения А" в последующем исследовании.

[Тест ингибирования роста *in vitro*]

[0056]

Пример 1: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию фолликулярной лимфомы человека DОНН-2

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Клеточная культура

Клетки DОНН-2 приобретали от Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Клетки культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, пенициллином и стрептомицином в условиях 37°C и 5%CO₂. Клетки собирали и ресуспендировали общепринятым способом и высевали на 96-луночный планшет в количестве 1000 клеток/лунка. Количество посеянных клеток определяли как количество клеток, из которого получали линейность кривой роста клеток до 6-х суток.

3) Добавление лекарственного средства

После культивирования клеток в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂ добавляли среду, содержащую различные концентрации соединения А или различные концентрации противоопухолевого средства, используемые в комбинации. После взбалтывания планшета клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 120 часов.

4) Тест ингибирования роста клеток

Тест ингибирования роста клеток проводили с использованием анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Fluor (Promega). В частности, в каждую лунку, подлежащую измерению, добавляли реагент CellTiter-Fluor, а затем проводили инкубацию. Затем измеряли интенсивность флуоресценции с использованием флуоресцентного устройства для считывания микропланшетов при длине волны 400 нм и

длине волны флуоресценции 505 нм.

5) Вычисление жизнеспособности клеток

Величину бесклеточной пустой смеси вычитали из измеренной величины для каждой лунки, и соотношение относительно контроля без лекарственного средства вычисляли и определяли в качестве жизнеспособности клеток. Величину IC_{50} , описанную ниже, определяли с использованием жизнеспособности клеток.

6) Анализ изоболограмм

Комбинированный эффект соединения А и комбинированного противоопухолевого средства (бендамустин) оценивали с использованием способа изоболограмм. В частности, оценку проводили следующим образом.

[0057]

Определяли величину IC_{50} для соединения А при каждой концентрации противоопухолевого средства (концентрация тестируемого соединения, требуемая для ингибирования пролиферации клеток на 50% относительно группы без введения). Фракционную ингибиторную концентрацию (FIC) противоопухолевого средства определяли путем деления каждой концентрации противоопухолевого средства на величину IC_{50} противоопухолевого средства отдельно. FIC соединения А определяли путем деления величины IC_{50} соединения А в данный момент времени на величину IC_{50} соединения А отдельно. Величину IC_{50} противоопухолевого средства при каждой концентрации соединения А определяли аналогичным образом. FIC соединения А определяли путем деления каждой концентрации соединения А на величину IC_{50} соединения А отдельно. FIC противоопухолевого средства определяли путем ведения величины IC_{50} противоопухолевого средства в данный момент времени на величину IC_{50} противоопухолевого средства отдельно. Общую величину FIC для каждой комбинации определяли как величину CI каждой комбинации. Вычисляли среднюю величину CI и 95% доверительный интервал. В таблице 1 представлены детали вычисления.

[Таблица 1]

Противоопухолевое средство: бендамустин, злокачественная опухоль: фолликулярная лимфома, клеточная линия: ДОНН-2, количество посеянных клеток: 1000 клеток/лунка				
Бендамустин (нМ)	Величина IC_{50} соединения А при каждой концентрации бендамустина (нМ)	FIC бендамустина	FIC соединения А	CI
0	381,08	0	1	-
1250	226,68	0,127	0,595	0,721
2500	98,50	0,253	0,258	0,512

5000	46,73	0,506	0,123	0,629
Соединение А (нМ)	Величина IC50 бендамустина при каждой концентрации соединения А (нМ)	FIC соединения А	FIC бендамустина	CI
0	9872,83	0	1	-
39,1	5585,72	0,103	0,566	0,668
78,1	2957,25	0,205	0,300	0,505
156,3	1500,73	0,410	0,152	0,562
312,5	40,54	0,820	0,004	0,824

[0058]

Кроме того, на фиг.1 представлен график, на который нанесена FIC каждого лекарственного средства (соединение А и бендамустин). На изоболограмме, кривые, находящиеся сверху справа, практически на линии или снизу слева, от прямой линии, соединяющей точки, где FIC каждого лекарственного средства равна 1, означают, что проявляется антагонистический, аддитивный или синергический эффект, соответственно. Кривые, представленные на фиг.1, находились снизу слева от прямой линии, что указывает на то, что комбинированное применение соединения А и бендамустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток DONN-2.

[0059]

Пример 2: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-231

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MDA-MB-231 приобретали от American Type Culture Collection (ATCC).

[0060]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 2000 клеток/лунка. На фиг.2 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.2, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и бендамустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MDA-MB-231.

[0061]

Пример 3: Комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека SMK-86

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный децитабин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки SMK-86 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0062]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 12000 клеток/лунка. На фиг.3 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.3, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и децитабина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток SMK-86.

[0063]

Пример 4: Комбинированный эффект соединения А и бусульфана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бусульфан приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от ATCC.

[0064]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.4 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.4, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и бусульфана продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0065]

Пример 5: Комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (CML) человека K562

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ломустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки K562 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0066]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. На фиг.5 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.5, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ломустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток K562.

[0067]

Пример 6: Комбинированный эффект соединения А и тиотепы на клеточную линию рака легкого человека A549

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованную тиотепу приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки A549 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0068]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. Фиг.6 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.6, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и тиотепы продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток A549.

[0069]

Пример 7: Комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию рака поджелудочной железы человека VxPC-3

1) Тестируемое вещество

Ломустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Использовали нерасфасованный порошок соединения А.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки VxPC-3 приобретали от ATCC.

[0070]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. На фиг.7 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.7, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ломустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток VxPC-3.

[0071]

Пример 8: Комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный мелфалан приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Среда и пассирование клеток

Клетки KG-1 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0072]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.8 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.8, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и мелфалана продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток KG-1.

[0073]

Пример 9: Комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) человека U2932

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ломустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки U2932 приобретали от DSMZ.

[0074]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 2000 клеток/лунка. На фиг.9 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.9, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ломустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток U2932.

[0075]

Пример 10: Комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) человека U2932

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный мелфалан приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки U2932 приобретали от DSMZ.

[0076]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 2000

клеток/лунка. На фиг.10 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.10, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и мелфалана продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток U2932.

[0077]

Пример 11: Комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный мелфалан приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от ATCC.

[0078]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.11 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.11, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и мелфалана продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0079]

Пример 12: Комбинированный эффект соединения А и ломустина на клеточную линию рака желудка человека MKN45

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ломустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MKN 45 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0080]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. На фиг.12 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.12, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ломустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MKN 45.

[0081]

Пример 13: Комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный

децитабин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от ATCC.

[0082]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.13 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.13, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и децитабина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0083]

Пример 14: Комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека OCI-AML2

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный децитабин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки OCI-AML2 приобретали от DSMZ.

[0084]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 4000 клеток/лунка. На фиг.14 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.14, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и децитабина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток OCI-AML2.

[0085]

Пример 15: Комбинированный эффект соединения А и цитарабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный цитарабин приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от ATCC.

[0086]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.15 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые,

представленные на фиг.15, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и цитарабина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0087]

Пример 16: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию рака молочной железы человека BT-474

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки BT-474 приобретали от АТСС.

[0088]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.16 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.16, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и бендамустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток BT-474.

[0089]

Пример 17: Комбинированный эффект соединения А и мелфалана на клеточную линию множественной миеломы человека RPMI 8226

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный мелфалан приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки RPMI 8226 приобретали от АТСС.

[0090]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 4000 клеток/лунка. На фиг.17 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.17, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и мелфалана продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток RPMI 8226.

[0091]

Пример 18: Комбинированный эффект соединения А и венетоклакса на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный

венетоклаксы приобретали от LC Laboratories.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки KG-1 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0092]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.18 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.18, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и венетоклакса продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток KG-1.

[0093]

Пример 19: Комбинированный эффект соединения А и ранимустина на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (СМЛ) человека K562

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ранимустин приобретали от Toronto Research Chemicals.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки K562 приобретали от Health Science Research Resources Bank.

[0094]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. На фиг.19 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.19, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ранимустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток K562.

[0095]

Пример 20: Комбинированный эффект соединения А и тиотепы на клеточную линию рака яичника человека SK-OV-3

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Используемую тиотепу приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки SK-OV-3 приобретали от ATCC.

[0096]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1. На фиг.20 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.20, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и тиотепы продемонстрировало

синергический эффект ингибирования роста клеток SK-OV-3.

[0097]

Пример 21: Комбинированный эффект соединения А и ибрутиниба на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ибрутиниб приобретали от MedChem Express.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от АТСС. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.21 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0098]

Кривые, представленные на фиг.21, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ибрутиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0099]

Пример 22: Комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию миелодиспластического синдрома человека SKM-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный децитабин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки SKM-1 приобретали от National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, JCRB Cell Bank (JCRB). Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.22 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0100]

Кривые, представленные на фиг.22, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и децитабина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток SKM-1.

[0101]

Пример 23: Комбинированный эффект соединения А и эрлотиниба на клеточную линию рака легкого человека A549

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный эрлотиниб приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки A549 приобретали от Health Science Research Resources Bank. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 1000 клеток/лунка. На фиг.23 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0102]

Кривые, представленные на фиг.23, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и эрлотиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток A549.

[0103]

Пример 24: Комбинированный эффект соединения А и gefitinib на клеточную линию рака легкого человека A549

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный gefitinib приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки A549 приобретали от Health Science Research Resources Bank. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 1000 клеток/лунка. Фиг.24 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0104]

Кривые, представленные на фиг.24, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и gefitinib продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток A549.

[0105]

Пример 25: Комбинированный эффект соединения А и gefitinib на клеточную линию рака легкого человека HCC 827

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный gefitinib приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки HCC 827 приобретали от ATCC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 4000 клеток/лунка. На Фиг.25 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0106]

Кривые, представленные на фиг.25, находились снизу слева от прямой линии,

указывая на то, что комбинированное применение соединения А и гефитиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток НСС 827.

[0107]

Пример 26: Комбинированный эффект соединения А и иматиниба на клеточную линию хронического миелогенного лейкоза (СМL) человека К562

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный иматиниб приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки К562 приобретали от Health Science Research Resources Bank. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 1000 клеток/лунка. На фиг.26 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0108]

Кривые, представленные на фиг.26, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и иматиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток К562.

[0109]

Пример 27: Комбинированный эффект соединения А и акситиниба на клеточную линию рака почки человека АСНН

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный акситиниб приобретали от Selleck Biotech.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки АСНН получали от Otsuka Pharmaceutical TRC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.27 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0110]

Кривые, представленные на фиг.27, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и акситиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток АСНН.

[0111]

Пример 28: Комбинированный эффект соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-453

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный лапатиниб приобретали от LC Laboratories.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MDA-MB-453 приобретали от ATCC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.28 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0112]

Кривые, представленные на фиг.28, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и лапатиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MDA-MB-453.

[0113]

Пример 29: Комбинированный эффект соединения А и ленватиниба на клеточную линию гепатомы человека Hep G2

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ленватиниб приобретали от Funakoshi Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки Hep G2 приобретали от ATCC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 2000 клеток/лунка. На фиг.29 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0114]

Кривые, представленные на фиг.29, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и ленватиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток Hep G2.

[0115]

Пример 30: Комбинированный эффект соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека SK-BR-3

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный лапатиниб приобретали от LC Laboratories.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки SK-BR-3 приобретали от ATCC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 4000 клеток/лунка. На фиг.30 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0116]

Кривые, представленные на фиг.30, находились снизу слева от прямой линии,

указывая на то, что комбинированное применение соединения А и лапатиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток SK-BR-3.

[0117]

Пример 31: Комбинированный эффект соединения А и афатиниба на клеточную линию рака легкого человека A549

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный афатиниб приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки A549 приобретали от Health Science Research Resources Bank. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 1000 клеток/лунка. На фиг.31 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0118]

Кривые, представленные на фиг.31, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и афатиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток A549.

[0119]

Пример 32: Комбинированный эффект соединения А и гилтеритиниба на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека MV-4-11

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный гилтеритиниб приобретали от Cayman Chemical Company.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки MV-4-11 приобретали от ATCC. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.32 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0120]

Кривые, представленные на фиг.32, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и гилтеритиниба продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток MV-4-11.

[0121]

Пример 33: Комбинированный эффект соединения А и 5-FU на линию клеток рака головы и шеи (фарингеальный) FaDu

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный 5-FU приобретали от Sigma-Aldrich.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки FaDu приобретали от АТСС. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 1000 клеток/лунка. На фиг.33 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0122]

Кривые, представленные на фиг.33, находились снизу слева от прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и 5-FU продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток FaDu.

[0123]

Сравнительный пример 1: Комбинированный эффект соединения А и винкристина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly18

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный винкристин приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки OCI-Ly18 приобретали от DSMZ. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 16000 клеток/лунка. На фиг.34 представлены результаты анализа изоболограмм. Кривые, представленные на фиг.34, находились практически на прямой линии, указывая на то, что комбинированное применение соединения А и винкристина продемонстрировало только аддитивный эффект на ингибирование роста клеток OCI-Ly18.

[0124]

Сравнительный пример 2: Комбинированный эффект соединения А и доцетаксела на клеточную линию рака молочной железы человека BT-474

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный доцетаксел приобретали от Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки BT-474 приобретали от АТСС. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, вычисление жизнеспособности клеток и анализ изоболограмм проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. На фиг.35 представлены результаты анализа изоболограмм.

[0125]

Кривые, представленные на фиг.35, находились практически на прямой линии,

указывая на то, что комбинированное применение соединения А и доцетаксела продемонстрировало только аддитивный эффект на ингибирование роста клеток ВТ-474.

[0126]

Пример 34: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) человека OCI-Ly7

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки OCI-Ly7 приобретали от DSMZ. Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток и вычисление жизнеспособности клеток проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/лунка. Результаты представлены в таблице 2.

[Таблица 2]

Противоопухолевое средство: бендамустин, злокачественная опухоль: диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), клеточная линия: OCI-Ly7, количество посеянных клеток: 8000 клеток/лунка		
0	0	1,00
0,25	0	0,79
0,5	0	0,76
1	0	0,61
2	0	0,50
0	1,25	0,93
0	2,5	0,87
0	5	0,66
0	10	0,29
0,25	1,25	0,62
0,5	2,5	0,54
1	5	0,35
2	10	0,16

3) Статистический анализ

Показатель аддитивности (CI) и 95% доверительный интервал вычисляли с использованием программного обеспечения SAS версии 9.3 (SAS Institute JAPAN).

[0127]

CI составил 0,67 и 95% доверительный интервал составил от 0,37 до 0,96.

[0128]

CI более 1, равно 1 или менее 1 означает наличие антагонистического, аддитивного

или синергического эффекта, соответственно. Таким образом, было обнаружено, что комбинированное применение соединения А и бендамустина продемонстрировало синергический эффект ингибирования роста клеток OCI-Ly7.

[0129]

Пример 35: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию лимфомы из клеток мантийной зоны человека REC-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Тест ингибирования роста клеток

Клетки REC-1 приобретали от DSMZ.

[0130]

Культивирование клеток, добавление лекарственного средства, тест ингибирования роста клеток, и вычисление жизнеспособности клеток проводили аналогично примеру 1 за исключением того, что количество клеток составляло 8000 клеток/луночка. С использованием полученных результатов показатель аддитивности (CI) и 95% доверительный интервал вычисляли аналогично тому, как в примере 34.

[0131]

CI составлял 0,65 и 95% доверительный интервал составлял от 0,34 до 0,96. Таким образом, было обнаружено, что комбинированное применение соединения А и бендамустина продемонстрировало синергический эффект на ингибирование роста клеток REC-1.

[Тест противоопухолевого эффекта *in vivo*]

[0132]

Пример 36: Комбинированный эффект соединения А и циклофосфида на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный циклофосфамид (Эндоксан для инъекций (торговый знак) 100 мг) приобретали от Shionogi & Co., Ltd.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением суспензии тестируемого вещества 10 мг/мл (раствор для введения 100 мг/кг). Суспензию тестируемого вещества разбавляли 1% раствором гипромеллозы с получением суспензий тестируемого вещества 3 мг/мл (раствор для введения 30 мг/кг) и 1 мг/мл (раствор для введения 10 мг/кг). Кроме того, 100 мг коммерчески доступного Эндоксана для инъекций растворяли в 20 мл солевого раствора и в момент применения приготавливали раствор 5 мг/мл (раствор для введения 50 мг/кг). Этот раствор использовали в качестве циклофосфида.

3) Клетки

OCI-Ly7 получали от DSMZ. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве $1,5 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали на стандартном рационе и питьевой воде в определенных свободных от патогенов (SPF) условиях на протяжении периода исследования. Суспензию клеток инокулировали в количестве 3×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мыши SCID в возрасте 6 недель. С использованием объема опухоли в качестве показателя, распределение на группы проводили посредством стратифицированного случайного способа отбора с использованием программного обеспечения SAS R9.3 (SAS Institute Japan).

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2). Соединение А вводили перорально один раз в сутки в течение 14 последовательных суток, и циклофосфамид вводили внутривентриально один раз в 3 или 4 суток, всего 4 раза. Для соответствия группе комбинации в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе монотерапии вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как в группе комбинированной терапии. Всем из животных проводили пероральное введение в течение 14 последовательных суток и внутривентриальное введение один раз в 3 или 4 суток (всего 4 раза). В каждой группе (N=8) проводили введение следующим образом.

(1) Контрольная группа (контроль в виде растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А (10 мг/кг): 10 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(3) Группа введения соединения А (30 мг/кг): 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(4) Группа соединения А (100 мг/кг): 100 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(5) Группа введения циклофосфамида (50 мг/кг): 50 мг/кг циклофосфамида (внутривентриальное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки)

(6) Группа комбинации 1: 10 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 50 мг/кг циклофосфамида (внутривентриальное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки)

(7) Группа комбинации 2: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 50 мг/кг циклофосфамида (внутривентриальное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки)

(8) Группа комбинации 3: 100 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 50 мг/кг циклофосфида (внутрибрюшинное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки).

Массу тела и диаметр опухоли измеряли с течением времени с использованием электронных весов и электронного цифрового толщиномера. Объем опухоли вычисляли из диаметров опухоли по следующей формуле: (длинный диаметр × [короткий диаметр]² × 0,5). С использованием вычисленного объема опухоли вычисляли относительный объем опухоли (соотношение объема опухоли в день измерения и исходного объема опухоли на 1). Время до достижения относительного объема опухоли каждого животного 1600% относительно дня распределения на группы (сутки 1) оценивали с использованием данных на ближайший день измерения достижения относительного объема опухоли 1600%. Замедление роста опухоли (TGD) вычисляли в качестве разности срединного времени достижения относительного объема опухоли в группах введения и контроля 1600%. Кроме того, уровень замедления роста опухоли (%TGD) вычисляли в соответствии со следующей формулой:

$$\%TGD = \{(T-C)/C\} \times 100,$$

где:

T: срединное время достижения относительного объема опухоли в группах введения 1600%

C: срединное время достижения относительного объема опухоли в контрольной группе 1600%.

б) Статистический анализ

Влияние монотерапии соединением А на замедление роста опухоли оценивали с использованием двухстороннего критерия Стила на основе времени достижения относительного объема опухоли каждого животного 1600% между контрольной группой (группа 1) каждой группы монотерапии соединением А (группы 2, 3 и 4).

[0133]

Влияние монотерапии циклофосфида на замедление роста опухоли оценивали с использованием двухстороннего критерия суммы рангов Уилкоксона на основе времени достижения относительного объема опухоли каждого животного 1600% между контрольной группой (группа 1) и группой монотерапии циклофосфидом (группа 5).

[0134]

Для исследования влияния группы комбинированной терапии соединения А и циклофосфида на замедление роста опухоли проводили двухсторонний тест Стила для сравнения каждой группы монотерапии (группы 2 и 5) с группой комбинированной терапии (группа 6), сравнения каждой группы монотерапии (группы 3 и 5) с группой комбинированной терапии (группа 7) и сравнения каждой группы монотерапии (группы 4 и 5) с группой комбинированной терапии (группа 8) в отношении времени до достижения относительного объема опухоли 1600%. Наличие комбинированного эффекта определяли, когда результат для группы комбинированной терапии был значимым относительно

		(сутки)	опухоли (%)				
Контрольн я группа (контроль в виде растворител я)	12,7	0	0	-	-	-	-
Группа введения соединения А (10 мг/кг)	13,2	0,5	3,5	0,2197 ^a	<0,01	-	-
Группа введения соединения А (30 мг/кг)	23,0	10,3	81,1	<0,01 ^a	-	<0,01	-
Группа введения соединения А (100 мг/кг)	31,5	18,8	147,6	<0,01 ^a	-	-	<0,01
Группа введения циклофосфа мида (50 мг/кг)	23,4	10,7	83,9	<0,01 ^b	<0,01	<0,01	<0,01
Группа введения соединения А (10 мг/кг) + циклофосфа мид (50 мг/кг)	>49,2	>36,5	>287	-	-	-	-

Группа введения соединения А (30 мг/кг) + циклофосфамид (50 мг/кг)	>50	>37,3	>293,7	-	-	-	-
Группа введения соединения А (10 мг/кг) + циклофосфамид (100 мг/кг)	>50	>37,3	>293,7	-	-	-	-

^a Результаты теста Стила для контрольной группы и каждой группы монотерапии соединением А для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 1600%)

^b Критерий суммы рангов Уилкоксона контрольной группы и группы монотерапии циклофосфамидом для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 1600%)

^{c, d, e} Результаты теста Стила для каждой группы монотерапии (10 мг/кг, 30 мг/кг или 100 мг/кг соединения А или 50 мг/кг циклофосфамида) и соответствующих групп комбинированной терапии (соединение А+50 мг/кг циклофосфамида) для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 1600%)

Поскольку значимое отличие замедления роста опухоли наблюдалось между группами комбинированной терапии и соответствующими группами монотерапии (50 мг/кг циклофосфамида и каждая доза соединения А), проводили двухсторонний ANOVA для оценки эффекта взаимодействия посредством сравнения между группами без введения циклофосфамида (контроль, монотерапия соединением А) и группами с введением циклофосфамида (монотерапия циклофосфамидом, комбинированная терапия). Наблюдали значимый синергический эффект взаимодействия для групп комбинированной терапии ($p < 0,01$)

[0137]

Пример 37: Комбинированный эффект соединения А и лапатиниба на клеточную линию рака молочной железы человека MDA-MB-453

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный лапатиниб представлял собой лапатиниб, соль ди-п-толуолсульфоновой кислоты, приобретенный от LC Laboratories.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением суспензии тестируемого вещества 20 мг/мл (суспензия для получения раствора для введения единственного средства и суспензия для получения раствора для комбинированного введения 100 мг/кг). Суспензии тестируемого вещества 20 мг/мл разбавляли 1% раствором гипромеллозы с получением суспензий тестируемого вещества 10 мг/мл (раствор для введения 100 мг/кг), 6 мг/мл (суспензия для получения раствора для комбинированного введения 30 мг/кг) и 3 мг/мл (30 мг/кг введение раствор). Лапатиниб суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением суспензии 20 мг/мл для получения комбинированного раствора для введения лапатиниба 100 мг/кг. Суспензию 20 мг/мл разбавляли 1% раствором гипромеллозы с получением суспензии 10 мг/мл для введения в качестве единственного соединения 100 мг/кг. Раствор введения группы комбинации получали путем смешения 6 мг/мл суспензии соединения А и суспензии лапатиниба 20 мг/мл в соотношении 1:1, или смешения 20 мг/мл суспензии соединения А и суспензии лапатиниба 20 мг/мл в соотношении 1:1.

3) Клетки

MDA-MB-453 получали от ATCC. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей NOD-SCID в возрасте 5 недель (NOD.CB17-Prkdcscid/J, выведенные Charles River Japan Co., Ltd.). Самок мышей NOD-SCID содержали аналогично тому, как в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 2×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мышей NOD-SCID в возрасте 6 недель, и мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2), и соединение А и лапатиниб вводили перорально один раз в сутки в течение 28 последовательных дней. В каждой группе (N=8) проводили введение следующим образом.

(1) Контрольная группа (группа растворителя): 1% раствор гипромеллозы

(2) Группа введения соединения А (30 мг/кг): 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток)

(3) Группа введения соединения А (100 мг/кг): 100 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток)

(4) Группа введения лапатиниба (100 мг/кг): 100 мг/кг лапатиниба (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток)

(5) Группа комбинации 1: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток) + 100 мг/кг лапатиниба (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток)

(6) Группа комбинации 2: 100 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных дней) + 100 мг/кг лапатиниба (пероральное введение один раз в сутки в течение 28 последовательных суток)

Измерение, вычисление замедления роста опухоли и статистический анализ проводили аналогично примеру 36.

6) Результаты

Время, требуемое для достижения относительного объема опухоли 200%, которое было конечной точкой оценки, составляло 22,8 суток (срединное время) в контрольной группе. В группе монотерапии уровень замедления роста опухоли (%) дозе 30 и 100 мг/кг соединения А составил 72,4% и >334,2%, соответственно. Уровень замедления роста опухоли (%) в дозе 100 мг/кг лапатиниба составил 50,0%. Было показано, что монотерапия 30 или 100 мг/кг соединения А или 100 мг/кг лапатиниба была эффективной.

[0138]

При комбинированной терапии как группа 30 мг/кг соединения А+100 мг/кг лапатиниба, так и группа 100 мг/кг соединения А+100 мг/кг лапатиниба продемонстрировали уровень замедления роста опухоли (%) >334,2%. Когда 30 мг/кг соединения А вводили в комбинации с 100 мг/кг лапатиниба, наблюдали комбинированный эффект и значительное взаимодействие, и комбинированный эффект был синергическим на значимом уровне. В комбинированной терапии опухоль полностью регрессировала при обеих дозах соединения А. Кроме того, в группе 100 мг/кг соединения А+100 мг/кг лапатиниба не наблюдали повторного роста опухоли до 2 месяцев после завершения комбинированного введения (таблица 4 и фиг.39 и 40).

7) Заключение

Эти результаты демонстрируют, что монотерапия соединением А в дозе 30 или 100 мг/кг, монотерапия лапатинибом в дозе 100 мг/кг и комбинированная терапия соединением А в дозе 30 или 100 мг/кг с лапатинибом в дозе 100 мг/кг во всех случаях имеет противоопухолевые эффекты на опухоли MDA-MB-453. Комбинированная терапия хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне.

[Таблица 4]

Группа	Срединно е время (сутки)	Замедлени е роста опухоли (сутки)	Уровень замедления роста опухоли (%)	Значение Р	Значение P ^c	Значение P ^d

Контрольная группа (контроль в виде растворителя)	22,8	0	0	-	-	-
Группа введения соединения А (30 мг/кг)	39,3	16,5	72,4	<0,01 ^a	<0,01	-
Группа введения соединения А (100 мг/кг)	>99,0	>76,2	>334,2	<0,01 ^a	-	0,2456
Группа введения лапатиниба (100 мг/кг)	34,2	11,4	50,0	<0,01 ^b	<0,01	<0,01
Группа введения соединения А (30 мг/кг) + лапатниб (100 мг/кг)	>99,0	>76,2	>334,2	-	-	-
Группа введения соединения А (100 мг/кг) + лапатиниб (100 мг/кг)	>99,0	>76,2	>334,2	-	-	-

^a Результаты теста Стила для контрольной группы и каждой группы монотерапии соединением А для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 200%)

^b Критерий суммы рангов Уилкоксона контрольной группы и группы монотерапии циклофосфамидом для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 200%)

^{c, d} Результаты теста Стила для каждой группы монотерапии (30 мг/кг или 100 мг/кг)

соединения А или 100 мг/кг лапатиниба) и соответствующих групп комбинированной терапии (соединение А+100 мг/кг лапатиниба) для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 200%)

Поскольку значимое отличие замедления роста опухоли наблюдалось между группами комбинированной терапии 30 мг/кг соединения А+100 мг/кг лапатиниба и соответствующими группами монотерапии, проводили двухсторонний ANOVA для оценки эффекта взаимодействия посредством сравнения между группами без введения лапатиниба (контроль, монотерапия соединением А) и группами с введением лапатиниба (монотерапия циклофосфамидом, комбинированная терапия). Наблюдали значимый синергический эффект взаимодействия для групп комбинированной терапии ($p < 0,01$).

[0139]

Пример 38: Комбинированный эффект соединения А и бендамустина на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин представлял собой бендамустина гидрохлорида гидрат, приобретенный от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением суспензии тестируемого вещества 3 мг/мл (30 мг/кг введение раствор). Бендамустин растворяли в солевом растворе, и раствор 1,5 мг/мл (раствор для введения 15 мг/кг) получали в момент применения.

3) Клетки

OCI-Ly7 получали от DSMZ. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в дозе $1,5 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали аналогично тому, как в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 3×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мышей SCID в возрасте 6 недель, и мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2). Соединение А вводили перорально один раз в сутки в течение 14 последовательных суток, и бендамустин вводили внутривентриально на сутки 2, 3, 4, 5 и 6, всего 5 раз. Для соответствия группе комбинации, в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и растворитель комбинированного лекарственного средства

вводили группе введения единственного средства, как в группе комбинации. Всем из животных проводили пероральное введение в течение 14 последовательных суток и внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки (всего 5 раз). В каждой группе (N=6) введение проводили следующим образом.

(1) Контрольная группа (контроль в виде растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А (30 мг/кг): 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(3) Группа введения бендамустина (15 мг/кг): 15 мг/кг бендамустина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки)

(4) Группа комбинации: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 15 мг/кг бендамустина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки)

Измерение, вычисление замедления роста опухоли и статистический анализ проводили аналогично примеру 36.

6) Результаты

Время, требуемое для достижения относительного объема опухоли 1600%, которое было конечным результатом оценки, составляло 15,5 суток (срединное время) в контрольной группе. При монотерапии уровень замедления роста опухоли (%) в дозе 30 мг/кг соединения А составил 54,2%. Уровень замедления роста опухоли (%) в дозе 15 мг/кг бендамустина составил 56,5%. Было показано, что монотерапия 30 мг/кг соединения А или 15 мг/кг бендамустина была эффективной.

[0140]

При комбинированной терапии группа 30 мг/кг соединения А+15 мг/кг бендамустина продемонстрировала уровень замедления роста опухоли (%) >222,6%. Когда соединение А вводили в комбинации с бендамустином, наблюдали комбинированный эффект и значимое взаимодействие, и комбинированный эффект был синергическим на значимом уровне. Кроме того, посредством комбинированной терапии происходила полная регрессия опухоли (таблица 5 и фиг.41).

7) Заключение

Эти результаты демонстрируют, что монотерапия соединением А в дозе 30 мг/кг, монотерапия бендамустином в дозе 15 мг/кг, и комбинированная терапия соединением А в дозе 30 мг/кг с бендамустином в дозе 15 мг/кг имеет противоопухолевый эффект на опухоль ОС1-Ly7. Комбинированная терапия хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне.

[Таблица 5]

Группа	Срединное время (сутки)	Замедление роста опухоли	Уровень замедления роста	Значение P ^a	Значение P ^b

		(сутки)	опухоли (%)		
Контрольная группа (контроль в виде растворителя)	15,5	0	0	-	-
Группа введения соединения А (30 мг/кг)	23,9	8,4	54,2	<0,01	<0,01
Группа введения бендамустина (15 мг/кг)	24,3	8,8	56,5	<0,01	<0,01
Группа введения соединения А (30 мг/кг) + бендамустин (15 мг/кг)	>50,0	>34,5	>222,6	-	-

^a Критерий суммы рангов Уилкоксона контрольной группы и каждой группы монотерапии соединением А и группы монотерапии бендамустином для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 1600%)

^b Результаты теста Стила для каждой группы монотерапии (30 мг/кг соединения А или 15 мг/кг бендамустина) и группы комбинированной терапии (30 мг/кг соединения А+15 мг/кг бендамустина) для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 1600%)

Поскольку значимое отличие замедления роста опухоли наблюдалось между группами комбинированной терапии и соответствующими группами монотерапии, проводили двухсторонний ANOVA для оценки эффекта взаимодействия посредством сравнения между группами без введения бендамустина (контроль, монотерапия соединением А) и группами с введением бендамустина (монотерапия бендамустином, комбинированная терапия). Наблюдали значимый синергический эффект взаимодействия для групп комбинированной терапии ($p < 0,01$).

[0141]

Пример 39: Комбинированный эффект соединения А и ритуксимаба на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный ритуксимаб (Ритуксан (торговый знак) 100 мг/10 мл) приобретали от Genentech, Inc.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением а суспензии тестируемого вещества 3 мг/мл (раствор для введения 30 мг/кг). Ритуксимаб разбавляли солевым раствором, и раствор 1 мг/мл (раствор для введения 10 мг/кг) получали в момент применения.

3) Клетки

OCI-Ly7 получали от DSMZ. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве $1,5 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей nude в возрасте 5 недель (BALB/c Slc-nu/nu, выведенные Japan SLC, Inc.). Самок мышей nude содержали аналогично примеру 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 3×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мышей nude в возрасте 6 недель и мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2). Соединение А вводили перорально один раз в сутки в течение 21 последовательных суток, и ритуксимаб вводили внутрибрюшинно на 2, 9 и 16 сутки, всего 3 раза. Для соответствия группе комбинации в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе введения единственного средства вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как и в группе комбинации. Всем из животных проводили пероральное введение в течение 21 последовательных суток, и внутрибрюшинное введение на 2, 9 и 16 сутки (всего 3 раза). В каждой группе (N=6) проводили введение следующим образом.

(1) Контрольная группа (контроль в виде растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А (30 мг/кг): 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 21 последовательных суток)

(3) Группа введения ритуксимаба: 10 мг/кг ритуксимаба (внутрибрюшинное введение на 2, 9 и 16 сутки)

(4) Группа комбинации: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 21 последовательных суток) + 10 мг/кг ритуксимаба (внутрибрюшинное введение на 2, 9 и 16 сутки)

Измерение, вычисление замедления роста опухоли и статистический анализ проводили аналогично примеру 36.

6) Результаты

Время, требуемое для достижения относительного объема опухоли 600%, которое было конечным результатом оценки, составило 16,3 суток (срединное время) в

контрольной группе. В группе монотерапии уровень замедления роста опухоли (%) в дозе 30 мг/кг соединения А составил 73,9%. Уровень замедления роста опухоли (%) в дозе 10 мг/кг ритуксимаба составил 74,2%. Было показано, что монотерапия 30 мг/кг соединения А или 10 мг/кг ритуксимаба была эффективной.

[0142]

При комбинированной терапии группа 30 мг/кг соединения А+10 мг/кг ритуксимаба продемонстрировала уровень замедления роста опухоли (%) >421,5%. Когда соединение А вводили в комбинации с ритуксимабом, наблюдали комбинированный эффект и взаимодействие на значимом уровне, и комбинированный эффект был синергическим на значимом уровне. Кроме того, посредством комбинированной терапии происходила полная регрессия опухоли (таблица 6 и фиг.42).

7) Заключение

Эти результаты демонстрируют, что монотерапия соединением А в дозе 30 мг/кг, монотерапия ритуксимабом в дозе 10 мг/кг и комбинированная терапия соединением А в дозе 30 мг/кг с ритуксимабом в дозе 10 мг/кг имеет противоопухолевый эффект на опухоль ОСI-Ly7. Комбинированная терапия хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне.

[Таблица 6]

Группа	Срединное время (сутки)	Замедление роста опухоли (сутки)	Уровень замедления роста опухоли (%)	Значение P ^a	Значение P ^b
Контрольная группа (контроль в виде растворителя)	16,3	0	0	-	-
Группа введения соединения А (30 мг/кг)	28,4	12,1	73,9	<0,01	<0,01
Группа введения ритуксимаба (10 мг/кг)	28,4	12,1	74,2	<0,01	<0,01
Группа введения соединения А (30 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг)	>85,0	>68,7	>421,5	-	-

^a Критерий суммы рангов Уилкоксона контрольной группы и каждой группы монотерапии соединением А и группы монотерапии ритуксимабом для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 600%)

^b Результаты теста Стила для каждой группы монотерапии (30 мг/кг соединения А или 10 мг/кг ритуксимаба) и группы комбинированной терапии (30 мг/кг соединения А+10 мг/кг ритуксимаба) для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 600%)

Поскольку значимое отличие замедления роста опухоли наблюдалось между группами комбинированной терапии и соответствующими группами монотерапии, проводили двухсторонний ANOVA для оценки эффекта взаимодействия посредством сравнения между группами без введения ритуксимаба (контроль, монотерапия соединением А) и группами с введением ритуксимаба (монотерапия ритуксимабом, комбинированная терапия). Наблюдали значимый синергический эффект взаимодействия для групп комбинированной терапии ($p < 0,01$).

[0143]

Пример 40: Комбинированный эффект соединения А и децитабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный децитабин (5-аза-2'-дезокситидин) приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением раствора 3 мг/мл для введения 30 мг/кг соединения А. Децитабин разбавляли солевым раствором с получением раствора 0,1 мг/мл для введения 1 мг/кг децитабина.

3) Клетки

KG-1 получали от Health Science Research Resources Bank. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве $2,5 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали аналогично тому, как в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 5×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мыши SCID в возрасте 6 недель, и мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2) и диаметр опухоли и массу тела окончательно измеряли и оценивали на следующие сутки

после завершения введения в течение 21 суток (сутки 23). Введение в каждой группе (N=8) проводили следующим образом. Для соответствия группе комбинации в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе введения единственного средства вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как и в группе комбинации.

(1) Контрольная группа (контроль в виде растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 21 последовательных суток)

(3) Группа введения децитабина: 1 мг/кг децитабина (внутрибрюшинное введение на 2, 5, 9, 12, 16 и 19 сутки)

(4) Группа комбинации: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 21 последовательных суток) + 1 мг/кг децитабина (внутрибрюшинное введение на 2, 5, 9, 12, 16 и 19 сутки)

Измерение массы тела и диаметра опухоли проводили с течением времени с использованием электронных весов и электронного цифрового толщиномера. Объем опухоли вычисляли из диаметров по следующей формуле: (длинный диаметр \times [короткий диаметр]² \times 0,5). Противоопухолевую активность выражали в качестве соотношения относительного объема опухоли в каждой группе введения и контрольной группе (Т/С%). Т/С% на 23 сутки вычисляли для каждой группы по формуле: относительный объем опухоли в каждой группе на 23 сутки [(объем опухоли в каждой группе на 23 сутки/объем опухоли в каждой группе на 1 сутки) \times 100]/средний относительный объем опухоли в контрольной группе на 23 сутки [(объем опухоли в контрольной группе на 23 сутки/объем опухоли в контрольной группе на 1 сутки) \times 100] \times 100.

6) Статистический анализ

Влияние комбинации соединения А и децитабина (группа 4) на относительный объем опухоли (23 сутки) оценивали с использованием критерия Даннетта (двухсторонний) против соединения А отдельно (группа 2) и децитабина отдельно (группа 3). Поскольку в группе 4 наблюдали значимое отличие против каждой группы монотерапии, проводили двухсторонний ANOVA (двунаправленный) для оценки эффекта взаимодействия между группами введения соединения А (группы 1 и 2) и группами введения децитабина (группы 3 и 4).

7) Результаты

Соединение А и децитабин продемонстрировали противоопухолевый эффект на опухоль KG-1. Комбинированная терапия децитабином и соединением А подавляла рост опухоли на значимом уровне более эффективно, чем монотерапия каждым из лекарственных средств (таблица 7 и фиг.43).

8) Заключение

Комбинированная терапия соединением А и децитабином хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне в модели на мышах,

имеющих опухоль KG-1. Этот результат служит основанием для проведения клинических испытаний комбинированной химиотерапии соединением А и децитабином.

[0144]

Пример 41: Комбинированный эффект соединения А и цитарабина на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный цитарабин (Циклоид (торговый знак) инъекционный, 60 мг) приобретали от Nippon Shinyaku Co., Ltd.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением раствором 3 мг/мл для введения 30 мг/кг соединения А. Цитарабин разбавляли солевым раствором с получением раствора 5 мг/мл для введения 50 мг/кг цитарабина.

3) Клетки

KG-1 получали от Health Science Research Resources Bank. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве 2,5×10⁸ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали аналогично тому, как в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 5×10⁷ клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мыши SCID в возрасте 6 недель, и мышей распределяли на группы аналогично тому, как и в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2). Диаметр опухоли и массу тела окончательно измеряли и оценивали на следующие сутки после завершения введения в течение 14 суток (сутки 16). В каждой группе (N=6) введение проводили следующим образом. Для соответствия группе комбинации, в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе введения единственного средства вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как и в группе комбинации.

(1) Контрольная группа (группа растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(3) Группа введения цитарабина: 50 мг/кг цитарабина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 и 13 сутки)

(4) Группа комбинации: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 50 мг/кг цитарабина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 и 13 сутки).

Измерение массы тела и диаметра опухоли проводили с течением времени с использованием электронных весов и электронного цифрового толщиномера. Объем опухоли вычисляли из диаметров по следующей формуле: (длинный диаметр × [короткий диаметр]² × 0,5). Противоопухолевую активность выражали в качестве соотношения относительного объема опухоли в каждой группе введения и контрольной группе (Т/С%). Т/С% на 16 сутки вычисляли для каждой группы по формуле: относительный объем опухоли в каждой группе на 16 сутки [(объем опухоли в каждой группе на 16 сутки/объем опухоли в каждой группе на 1 сутки) × 100]/средний относительный объем опухоли в контрольной группе на 16 сутки [(объем опухоли в контрольной группе на 16 сутки/объем опухоли в контрольной группе на 1 сутки) × 100] × 100.

6) Статистический анализ

Влияние комбинации соединения А и цитарабина (группа 4) на относительный объем опухоли (16 сутки) оценивали с использованием критерия Даннетта (двухсторонний) против соединения А отдельно (группа 2) и цитарабина отдельно (группа 3). Поскольку в группе 4 наблюдали значимое отличие против каждой группы монотерапии, проводили двухсторонний ANOVA (двунаправленный) для оценки эффекта взаимодействия между группами введения соединения А (группы 1 и 2) и группами введения цитарабина (группы 3 и 4).

7) Результаты

Соединение А и цитарабин продемонстрировали противоопухолевый эффект на опухоль KG-1. Комбинированная терапия цитарабином и соединением А подавляла рост опухоли на значимом уровне более эффективно, чем монотерапия каждым из лекарственных средств (таблица 7 и фиг.44).

8) Заключение

Комбинированная терапия соединением А и цитарабином хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне в модели на мышах, имеющих опухоль KG-1. Этот результат служит основанием для проведения клинических испытаний комбинированной химиотерапии соединением А и цитарабином.

[Таблица 7]

Происхождение	Клеточная линия	Монотерапия соединением А (перорально, введение каждые сутки)		Монотерапия другим противоопухолевым веществом		Комбинированная терапия
		Доза [мг/кг]	Т/С (%)	Комбинированное	Т/С (%)	

				лекарственное средство (доза [мг/кг], путь введения, частота введения)		
Острый миелогенный лейкоз	KG-1	30	45,2	Децитабин (1, внутривенно, два раза в неделю)	27,7	5,2*
Острый миелогенный лейкоз	KG-1	30	52,0	Цитарабин (50, внутривенно, введение в течение 5 дней и перерыв на 2 дня)	62,3	5,4*

* Синергический эффект комбинации [0145]

Пример 42: Комбинированный эффект трех лекарственных средств: соединения А, бендамустина и ритуксимаба на клеточную линию диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы человека OCI-Ly7

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный бендамустин представлял собой бендамустина гидрохлорида гидрат, приобретенный от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Использованный ритуксимаб (Ритуксан (торговый знак) 100 мг/10 мл) приобретали от Genentech, Inc.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением суспензии тестируемого вещества 3 мг/мл (раствор для введения 30 мг/кг). Бендамустин растворяли в солевом растворе и раствор 1 мг/мл (раствор для введения 10 мг/кг) получали в момент применения. Ритуксимаб разбавляли солевым раствором, и раствор 1 мг/мл (раствор для введения 10 мг/кг) получали в момент применения.

3) Клетки

OCI-Ly7 получали от DSMZ. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве 1,5×10⁸ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали аналогично тому, как и в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 3×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мыши SCID в возрасте 6 недель, и мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (сутки 2). Соединение А вводили перорально один раз в сутки в течение 14 последовательных суток. Бендамустин вводили внутривнутрибрюшинно на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки, всего 5 раз. Ритуксимаб вводили внутривнутрибрюшинно на 2 и 9 сутки, всего два раза. Для соответствия группе комбинации в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе введения единственного средства вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как и в группе комбинации. Всем из животных проводили пероральное введение в течение 14 последовательных суток и внутривнутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5, 6 и 9 сутки. В каждой группе (N=6) проводили введение следующим образом.

(1) Контрольная группа (группа растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор.

(2) Группа введения соединения А: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(3) Группа введения бендамустина (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг): 10 мг/кг бендамустина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки) + 10 мг/кг ритуксимаба (внутрибрюшинное введение на 2 и 9 сутки)

(4) Группа комбинации трех лекарственных средств: 30 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 10 мг/кг бендамустина (внутрибрюшинное введение на 2, 3, 4, 5 и 6 сутки) + 10 мг/кг ритуксимаба (внутрибрюшинное введение на 2 и 9 сутки).

Измерение, вычисление замедления роста опухоли и статистический анализ проводили аналогично примеру 36.

6) Результаты

Время, требуемое для достижения относительного объема опухоли 800%, которое было конечной точкой оценки, составляло 9,9 суток (срединное время) в контрольной группе. Группа введения соединения А (30 мг/кг) продемонстрировала уровень замедления роста опухоли (%)83,8%. Группа введения бендамустина (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг) продемонстрировала уровень замедления роста опухоли (%) 144,4%. Было показано, что 30 мг/кг соединения А и 10 мг/кг бендамустина+10 мг/кг ритуксимаба были эффективными.

[0146]

В комбинированной терапии из трех лекарственных средств группа введения 30 мг/кг соединения А+10 мг/кг бендамустина+10 мг/кг ритуксимаба продемонстрировала уровень замедления роста опухоли (%)>829,3%. Когда соединение А вводили в комбинации с бендамустином и ритуксимабом, наблюдали эффект комбинации трех лекарственных средств и значимое взаимодействие, и эффект комбинации трех лекарственных средств был синергическим на значимом уровне. Кроме того, комбинированная терапия тремя лекарственными средствами вызвала полную регрессию опухоли (таблица 8 и фиг.45).

7) Заключение

Было показано, что монотерапия 30 мг/кг соединения А, комбинированная терапия 10 мг/кг бендамустина+10 мг/кг ритуксимаба, и комбинированная терапия тремя лекарственными средствами: 30 мг/кг соединения А, 10 мг/кг бендамустина и 10 мг/кг ритуксимаба имела значительную противоопухолевую активность в модели на мышах, имеющих опухоль OCI-Ly7. Комбинированная терапия тремя лекарственными средствами была хорошо переносимой и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне.

[Таблица 8]

Группа	Срединное время (сутки)	Замедление роста опухоли (сутки)	Уровень замедления роста опухоли (%)	Значение P ^a	Значение P ^b
Контрольная группа (контроль в виде растворителя)	9,9	0	0	-	-
Группа введения бендамустина (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг)	24,2	14,3	144,4	<0,01	<0,01
Группа введения соединения А (30 мг/кг) + бендамустин (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг)	>92,0	>82,1	>829,3	-	-

^a Критерий суммы рангов Уилкоксона контрольной группы и каждой группы введения соединения А, и контрольной группы и группы введения бендамустина+ритуксимаб для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 800%)

^b Результаты теста Стила для группы введения соединения А (30 мг/кг), группы введения бендамустина (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг), и группы введения трех лекарственных средств (30 мг/кг соединения А+10 мг/кг бендамустина+10 мг/кг ритуксимаба) для конечного результата оценки (относительный объем опухоли 800%)

Поскольку значимое отличие замедления роста опухоли наблюдалось между группами введения трех лекарственных средств, соответствующей группой введения соединения А (30 мг/кг) и группой введения бендамустина (10 мг/кг) + ритуксимаб (10 мг/кг), проводили двухсторонний ANOVA для оценки эффекта взаимодействия посредством сравнения между группами без введения бендамустина+ритуксимаб (контроль, группа введения соединения А) и группами с введением бендамустина+ритуксимаб (группа введения бендамустина+ритуксимаб, группа введения трех лекарственных средств). Наблюдали значимый синергический эффект взаимодействия для группы трех лекарственных средств ($p < 0,01$).

[0147]

Пример 43: Комбинированный эффект трех лекарственных средств: соединения А, децитабина и венетоклакса на клеточную линию острого миелогенного лейкоза (AML) человека KG-1

1) Тестируемое вещество

Использовали нерасфасованный порошок соединения А. Использованный венетоклакс приобретали от LC Laboratories. Использованный децитабин (5-аза-2'-дезоксцитидин) приобретали от Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

2) Получение тестируемого вещества

Соединение А и венетоклакс суспендировали в 1% растворе гипромеллозы с получением раствора 5 мг/мл для введения 50 мг/кг соединения А. Децитабин разбавляли солевым раствором с получением раствора 0,1 мг/мл для введения 1 мг/кг децитабина.

3) Клетки

Клетки KG-1 получали от Health Science Research Resources Bank. Клетки культивировали в среде 1640, дополненной 10% инактивированной (обработанной при 56°C в течение 30 минут) эмбриональной телячьей сывороткой, в условиях 37°C и 5% CO₂. Собранные клетки суспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 в количестве $2,5 \times 10^8$ клеток/мл.

4) Животные

Использовали самок мышей SCID в возрасте 5 недель (C.B-17/Icr-scid/scid Jcl, выведенные в CLEA Japan, Inc.). Самок мышей SCID содержали аналогично тому, как в примере 36. Суспензию клеток инокулировали в количестве 5×10^7 клеток/организм в подкожное пространство правой подмышечной области мыши SCID в возрасте 6 недель, и

мышей распределяли на группы аналогично тому, как в примере 36, с использованием объема опухоли в качестве показателя.

5) Введение и измерение

Введение начинали на следующие сутки после распределения на группы (2 сутки) и диаметр опухоли и массу тела окончательно измеряли и оценивали на следующие сутки после завершения введения в течение 14 суток (16 сутки). В каждой группе (N=6) проводили введение следующим образом. Для соответствия группе комбинации, в контрольной группе вводили растворитель каждого лекарственного средства, и в группе введения единственного средства вводили растворитель комбинированного лекарственного средства, как и в группе комбинации.

(1) Контрольная группа (группа растворителя): 1% раствор гипромеллозы, солевой раствор

(2) Группа введения соединения А: 50 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток)

(3) Группа введения венетоклакса+децитабин: 50 мг/кг венетоклакса (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 1 мг/кг децитабина (внутрибрюшинное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки)

(4) Группа комбинации трех лекарственных средств: 50 мг/кг соединения А (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 50 мг/кг венетоклакса (пероральное введение один раз в сутки в течение 14 последовательных суток) + 1 мг/кг децитабина (внутрибрюшинное введение на 2, 5, 9 и 12 сутки)

Измерение массы тела и диаметра опухоли проводили с течением времени с использованием электронных весов и электронного цифрового толщиномера. Объем опухоли вычисляли из диаметров по следующей формуле: (длинный диаметр × [короткий диаметр]² × 0,5). Противоопухолевую активность выражали в качестве соотношения относительного объема опухоли в каждой группе введения и контрольной группе (Т/С%). Т/С% на 16 сутки вычисляли для каждой группы по формуле: относительный объем опухоли в каждой группе на 16 сутки [(объем опухоли в каждой группе на 16 сутки/объем опухоли в каждой группе на 1 сутки) × 100]/средний относительный объем опухоли в контрольной группе на 16 суток [(объем опухоли в контрольной группе на 16 суток/объем опухоли в контрольной группе на 1 сутки) × 100] × 100.

6) Статистический анализ

Влияние комбинации трех лекарственных средств: соединения А, и венетоклакса, и децитабина (группа 4) на относительный объем опухоли (16 сутки) оценивали посредством критерия Даннетта (двухсторонний) против соединения А отдельно (группа 2) и венетоклакса+децитабин (группа 3). Поскольку наблюдали значимое отличие в группе 4 против групп 2 и 3, проводили двухсторонний ANOVA (двунаправленный) для оценки эффекта взаимодействия между группами введения контроля и соединения А (группы 1 и 2) и группой введения венетоклакса+децитабин и группой комбинации трех лекарственных средств (группы 3 и 4).

6) Результаты

Соединение А и венетоклак+децитабин продемонстрировали противоопухолевый эффект против опухоли KG-1. Комбинированная терапия тремя лекарственными средствами: венетоклаксом, децитабином и соединением А подавляла рост опухоли на значимом уровне более эффективно, чем введение единственного средства соединения А и введение венетоклакса и децитабина (таблица 9 и фиг.46).

7) Заключение

Комбинированная терапия тремя лекарственными средствами: соединением А, венетоклаксом и децитабином хорошо переносилась и продемонстрировала синергические эффекты на значимом уровне в модели на мышах, имеющих опухоль KG-1. Этот результат служит основанием для проведения клинических испытаний комбинированной химиотерапии соединением А, венетоклаксом и децитабином.

[Таблица 9]

Происхождение	Клеточная линия	Введение единственного средства соединения А (перорально, введение каждые сутки)		Монотерапия другим противоопухолевым веществом		Комбинированная терапия
		Доза [мг/кг]	Т/С (%)	Комбинированное лекарственное средство (доза [мг/кг], путь введения, частота введения)	Т/С (%)	
Острый миелогенный лейкоз	KG-1	50	29,2	Венетоклакс (50, перорально, введение каждые сутки) + децитабин (1, внутривенно, два раза в неделю)	32,6	1,6*

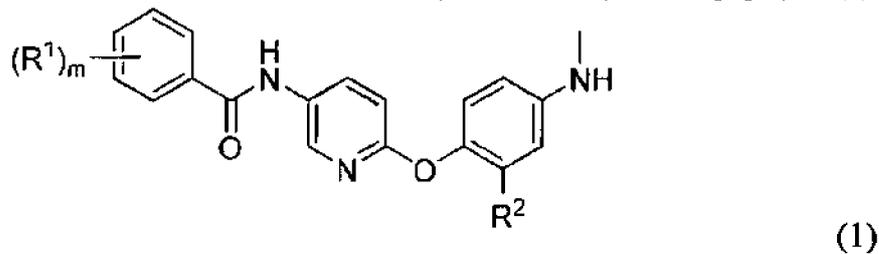
* Синергический эффект комбинации

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевая композиция, содержащая соединение (B) или его соль, для применения в комбинации с противоопухолевым средством (A):

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

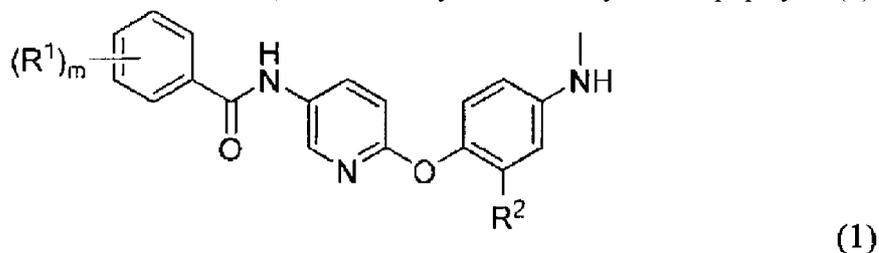
R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

2. Противоопухолевая композиция, содержащая соединение (B) или его соль, для применения для введения субъекту, которому будут вводить или вводят противоопухолевое средство (A):

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

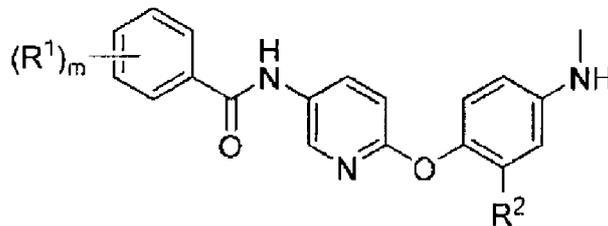
m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

3. Противоопухолевая композиция, содержащая:

противоопухолевое средство (А), и
соединение (В) или его соль:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(В) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где соединение (В) или его соль представляют собой по меньшей мере одно соединение или его соль, выбранные из группы, состоящей из:

- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2-фтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2,3,4-трифтор-N-{6-[2-фтор-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамида,
- N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,
- 2-фтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамида,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамида,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-феноксибензамида,

N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бифенил-4-карбоксамид,

2-фтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-

(трифторметил)бензамида,

2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метокси-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,

2,3,4-трифтор-N-{6-[2-метил-4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида,

N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида,

2-фтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}-4-(трифторметил)бензамида

и

2,3,4-трифтор-N-{6-[4-(метиламино)фенокси]пиридин-3-ил}бензамида.

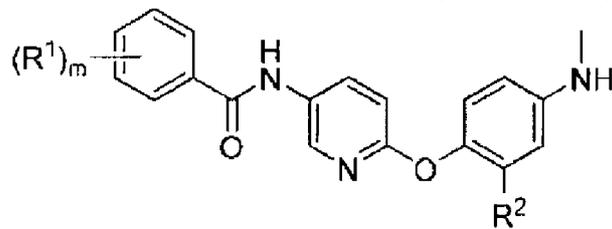
5. Набор, содержащий:

противоопухолевое средство (А), и

противоопухолевую композицию, содержащую соединение (В) или его соль:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(В) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



(1)

где

R¹ обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

R² обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

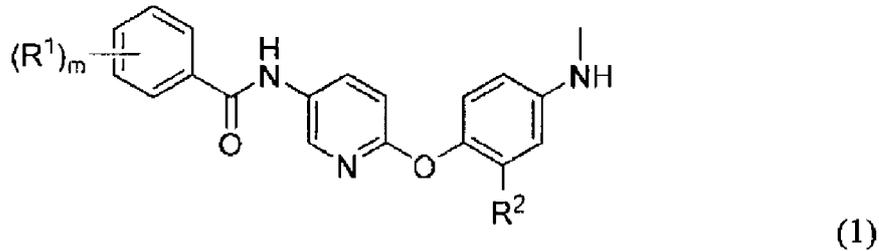
m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R¹ являются одинаковыми или различаются.

6. Способ предупреждения или лечения опухоли, причем способ включает введение противоопухолевого средства (А) и соединения (В) или его соли субъекту:

(А) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы,

состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

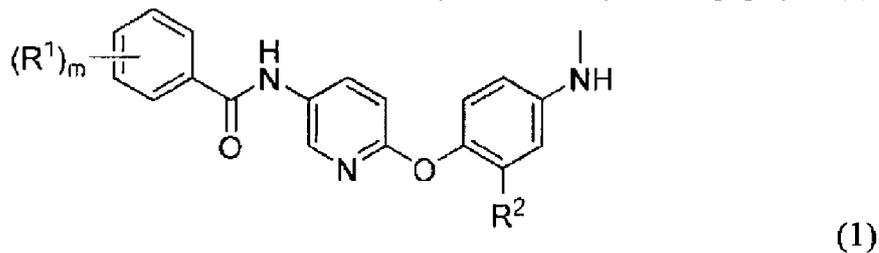
R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

7. Соединение (B) или его соль для применения в комбинации со следующим противоопухолевым средством (A) для предупреждения или лечения опухоли:

(A) по меньшей мере одно противоопухолевое средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих средств, распознающих CD20 молекул, ингибиторов метилирования ДНК, антиметаболитов пиримидинов, антиметаболитов пуринов, антифолатов, ингибиторов Vcl-2 и ингибиторов тирозинкиназ;

(B) соединение или его соль, соответствующие следующей формуле (1):



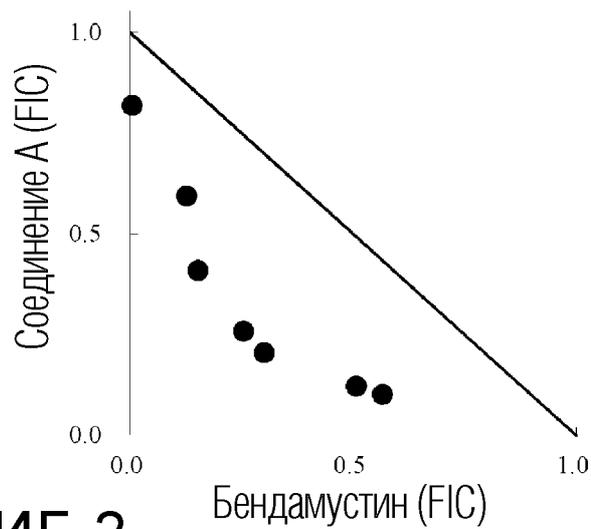
где

R^1 обозначает атом галогена, арильную группу, арилоксигруппу или низшую алкильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими атомами галогенов;

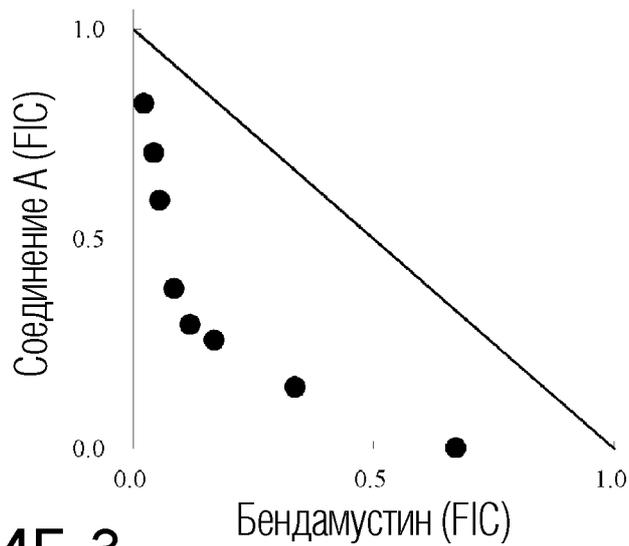
R^2 обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу или низшую алкоксигруппу; и

m обозначает целое число от 1 до 3, при условии, что, когда m обозначает 2 или 3, R^1 являются одинаковыми или различаются.

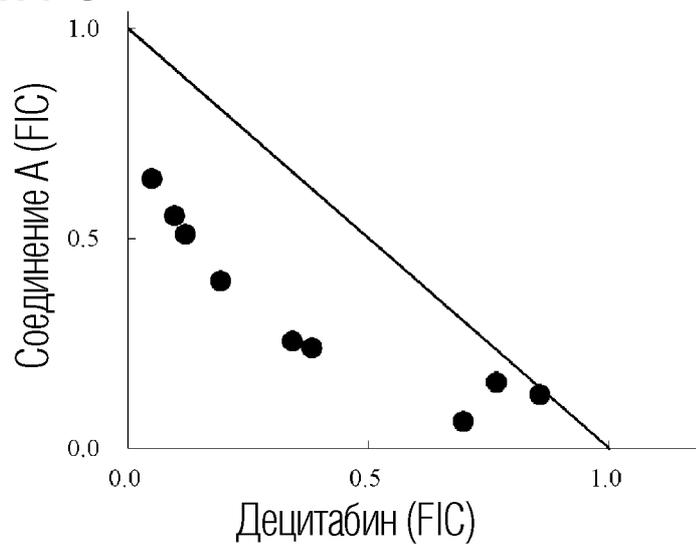
ФИГ. 1



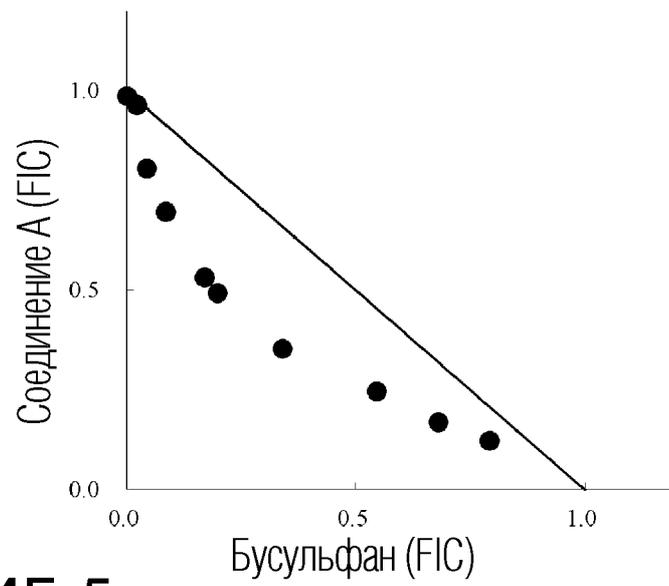
ФИГ. 2



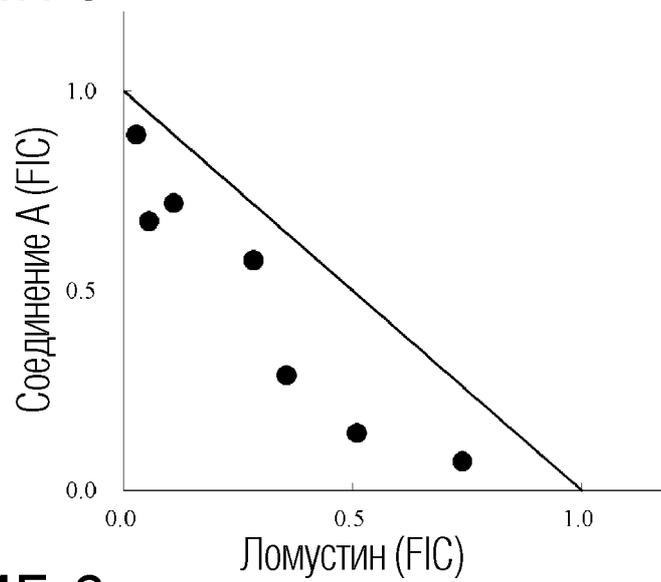
ФИГ. 3



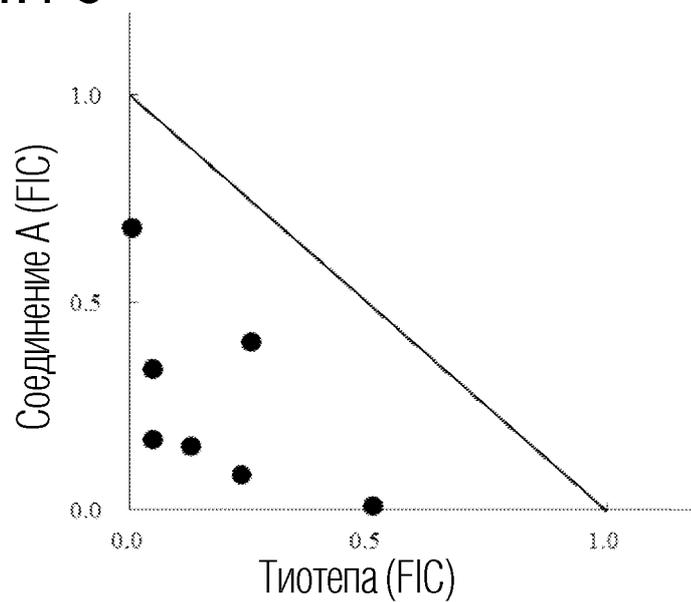
ФИГ. 4



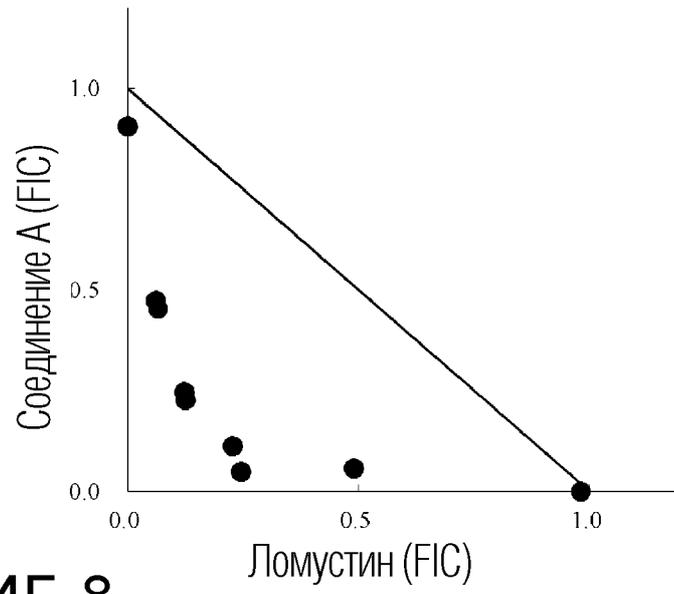
ФИГ. 5



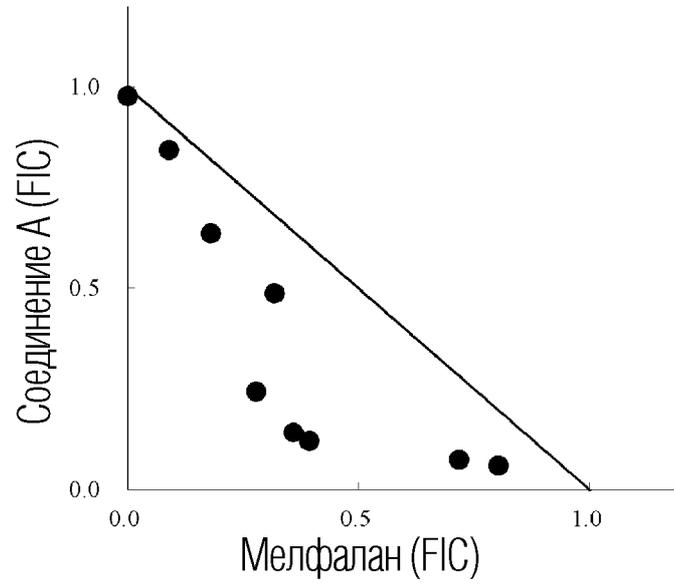
ФИГ. 6



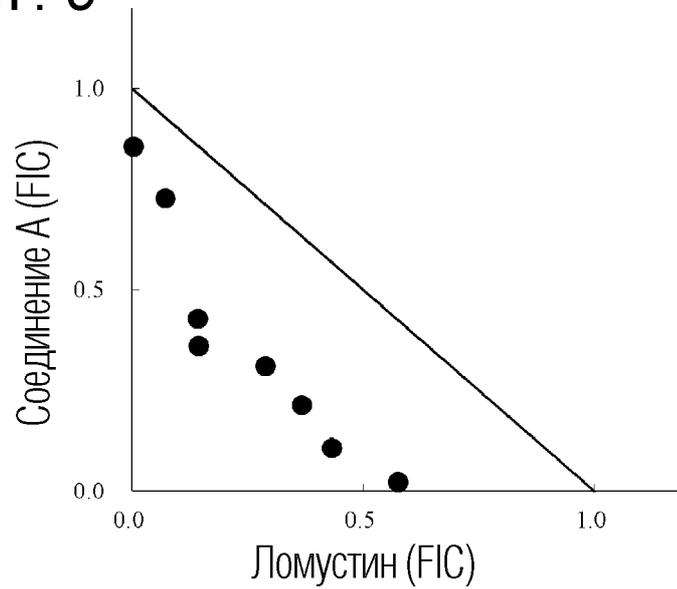
ФИГ. 7



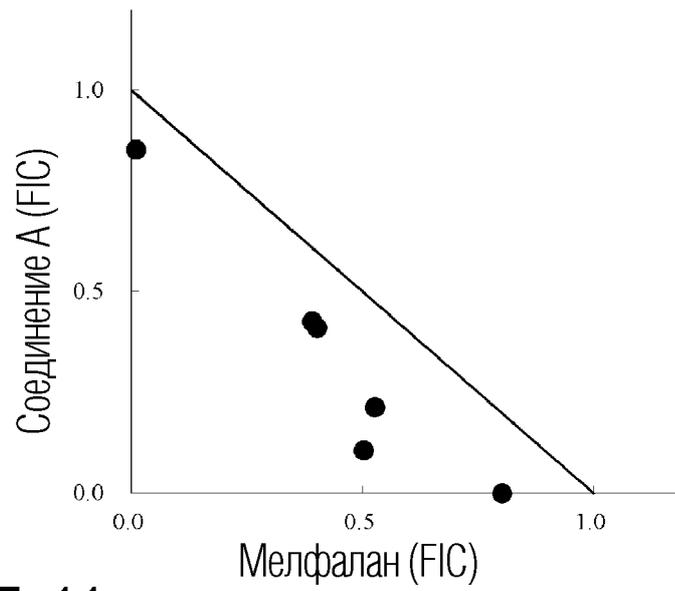
ФИГ. 8



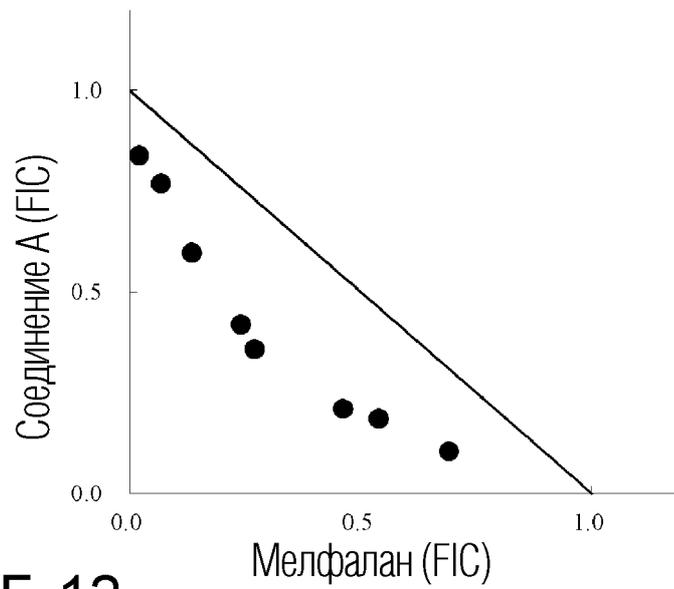
ФИГ. 9



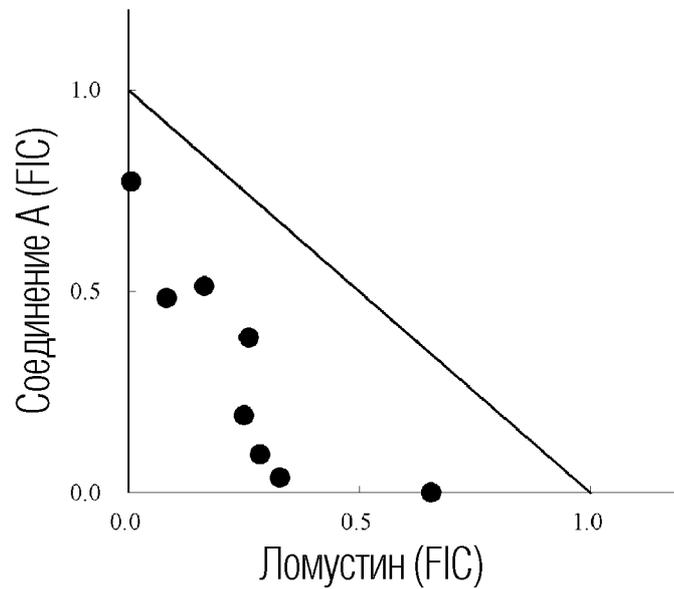
ФИГ. 10



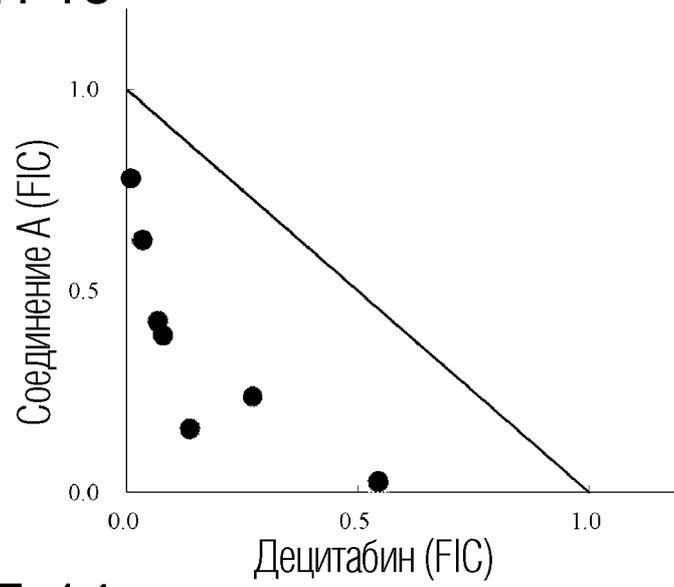
ФИГ. 11



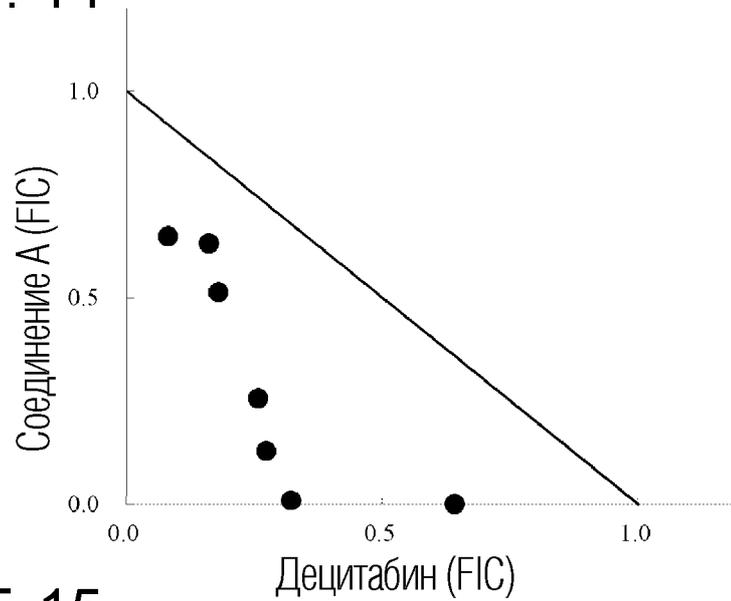
ФИГ. 12



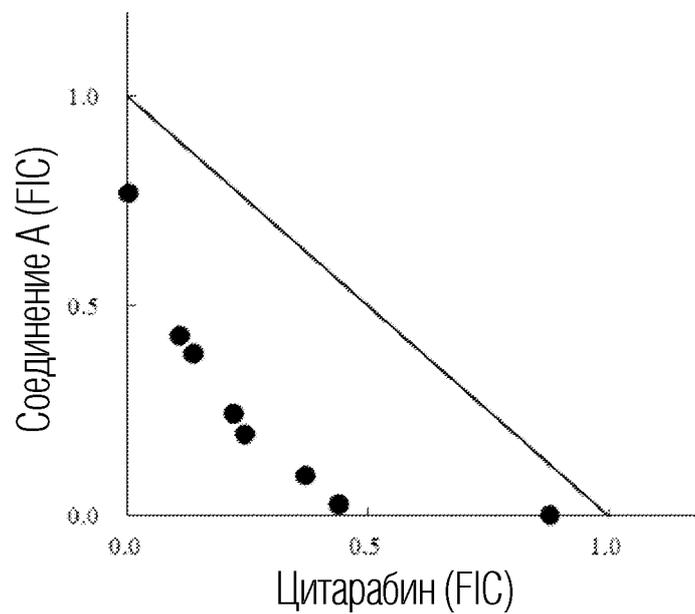
ФИГ. 13



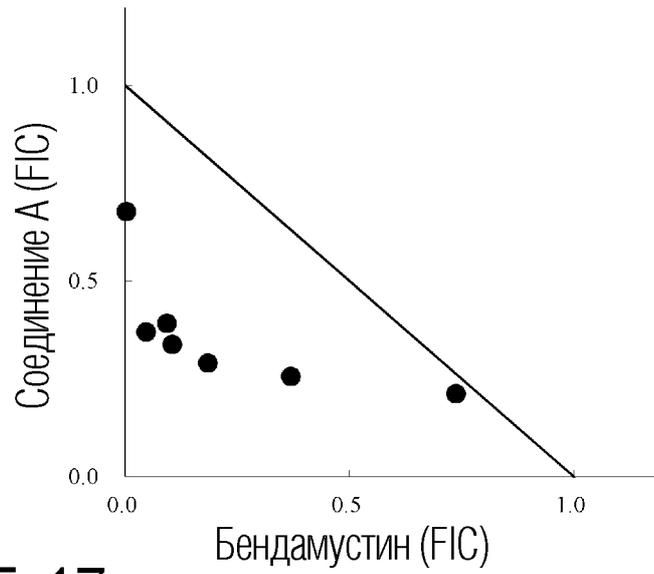
ФИГ. 14



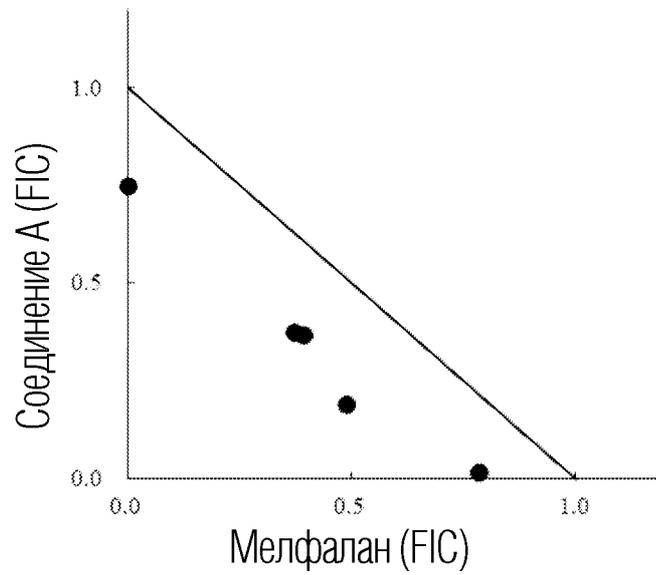
ФИГ. 15



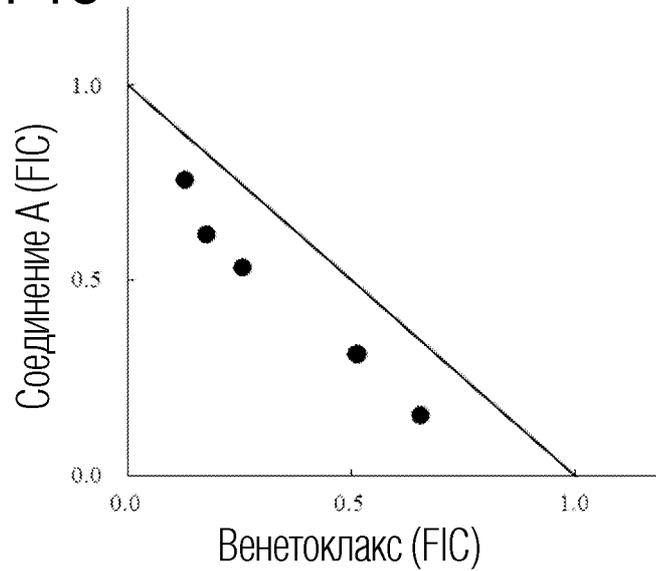
ФИГ. 16



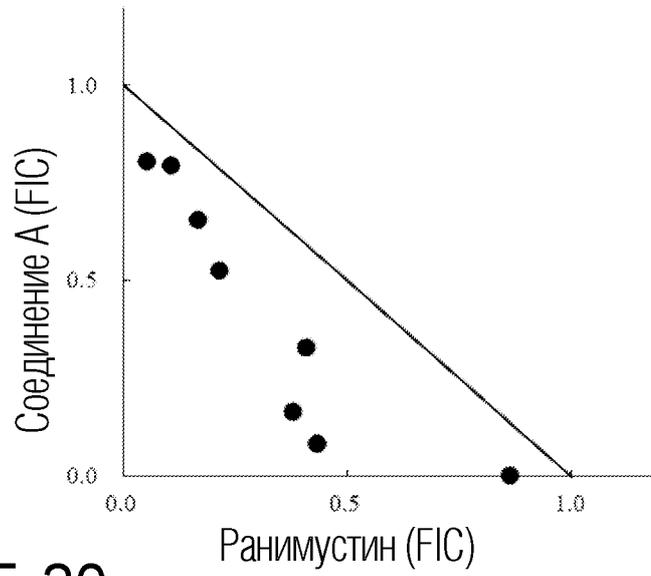
ФИГ. 17



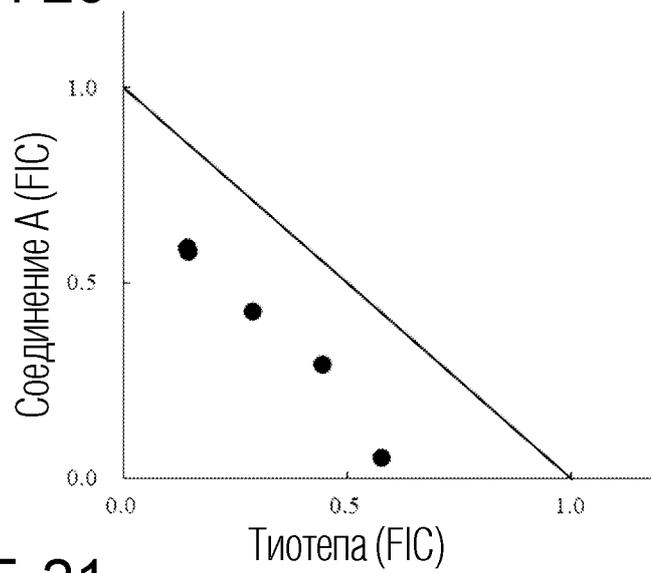
ФИГ. 18



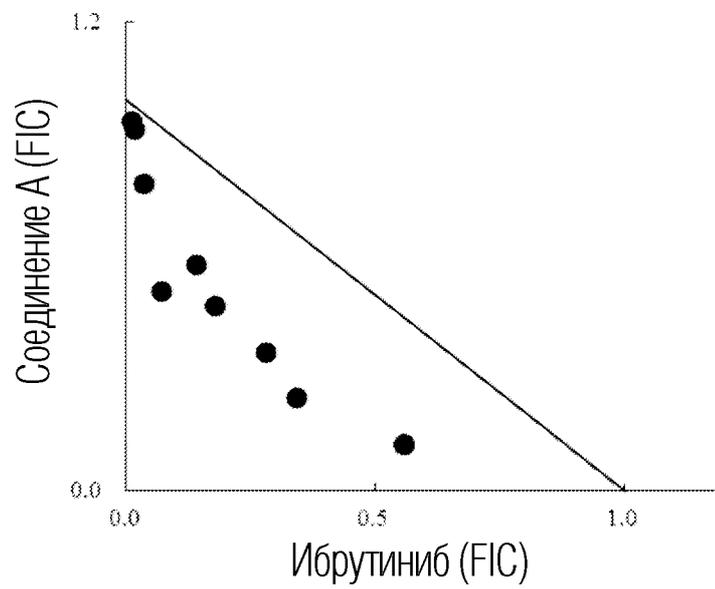
ФИГ. 19



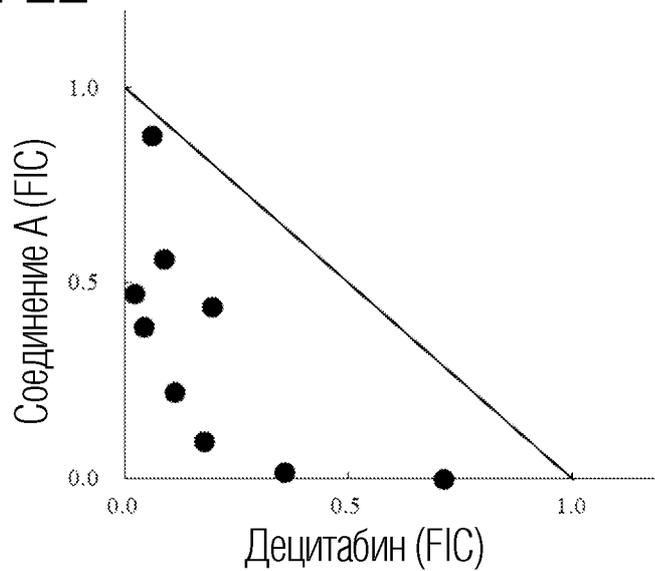
ФИГ. 20



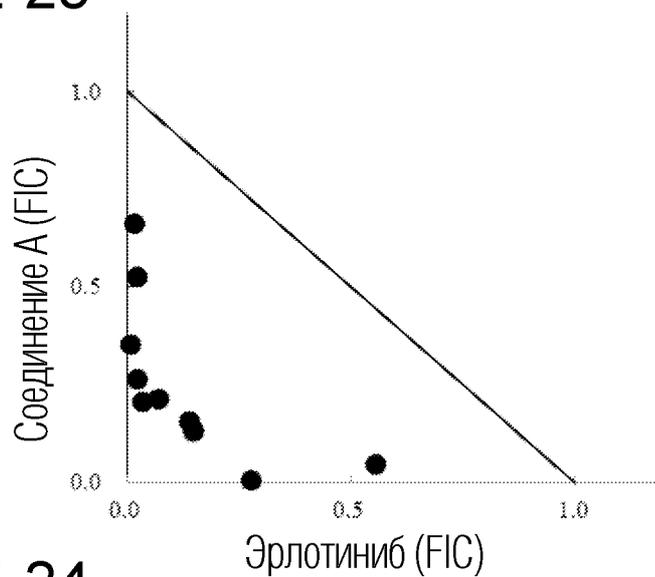
ФИГ. 21



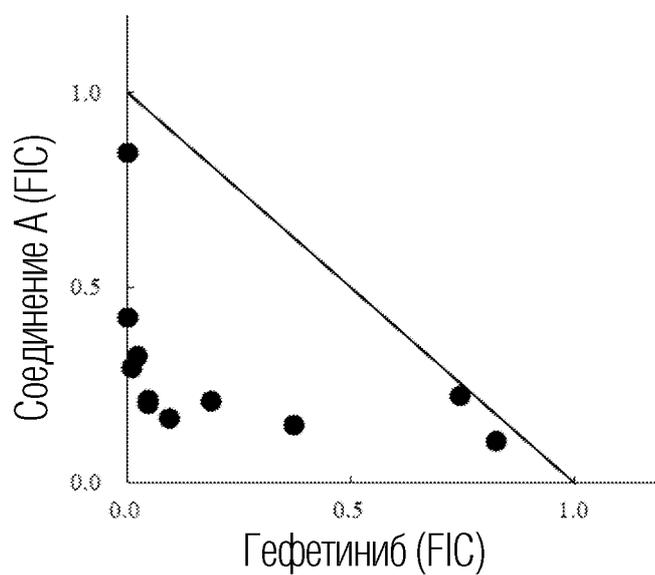
ФИГ. 22



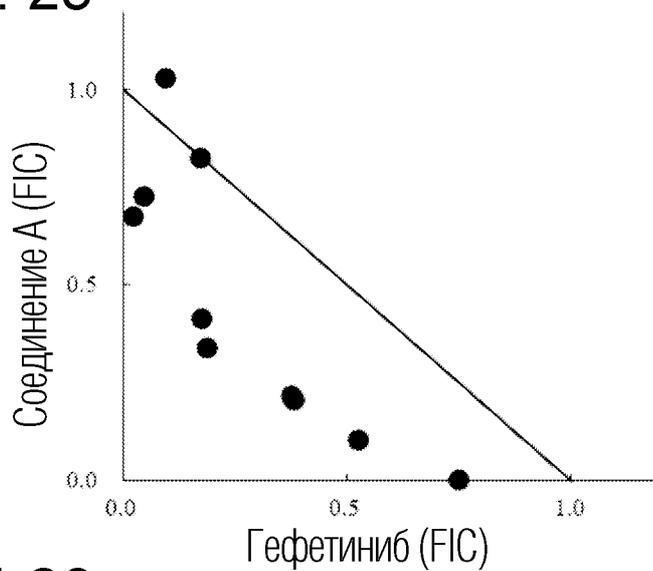
ФИГ. 23



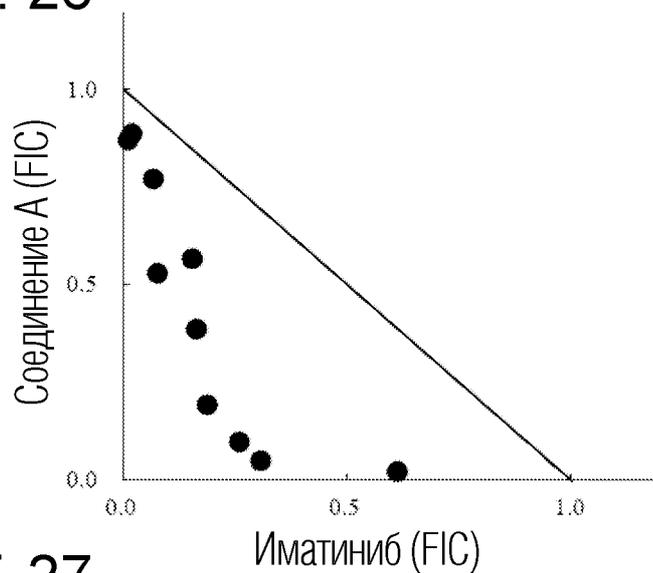
ФИГ. 24



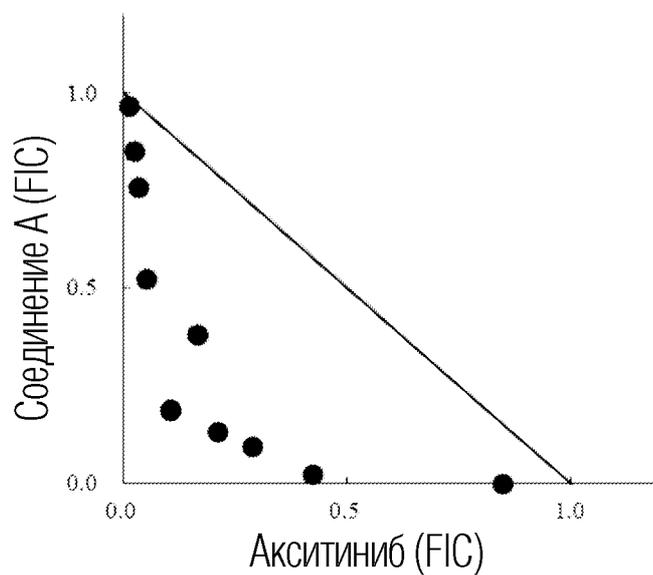
ФИГ. 25



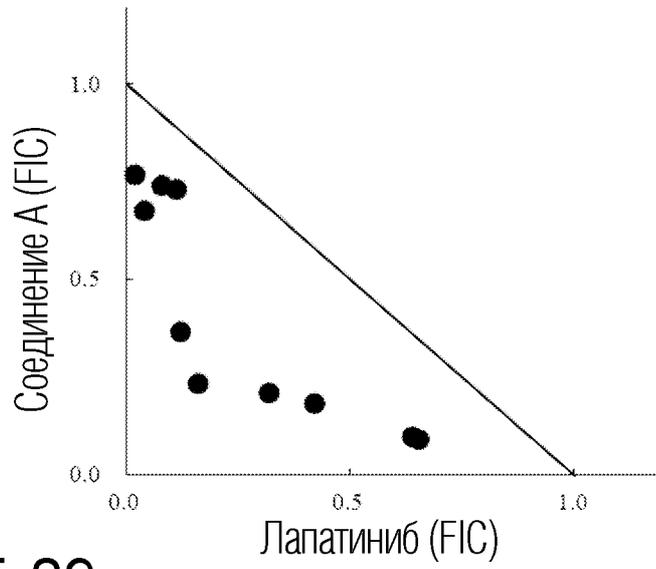
ФИГ. 26



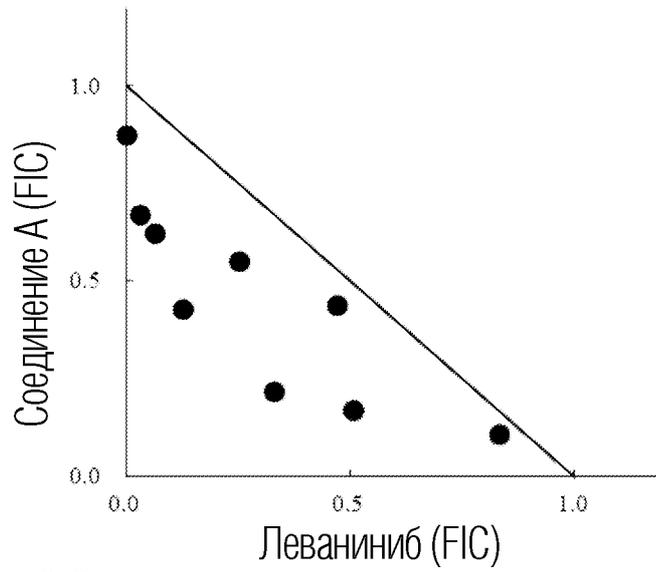
ФИГ. 27



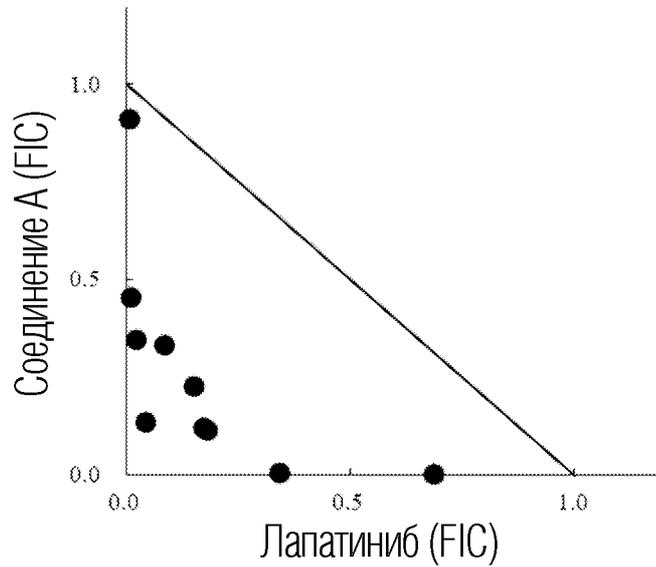
ФИГ. 28



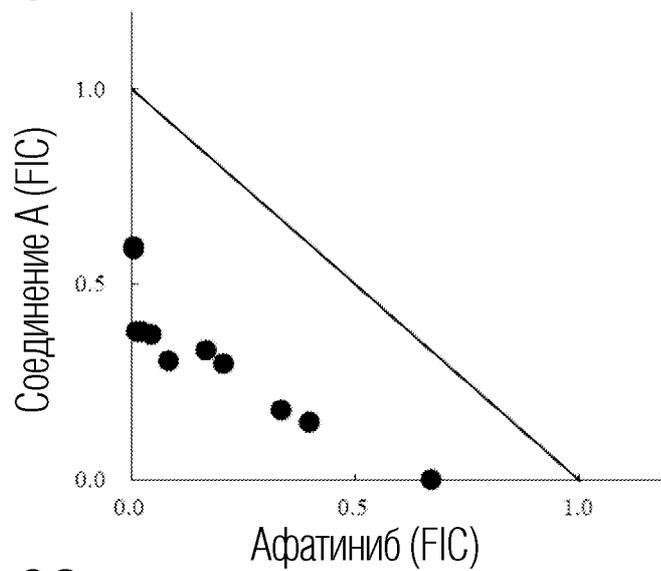
ФИГ. 29



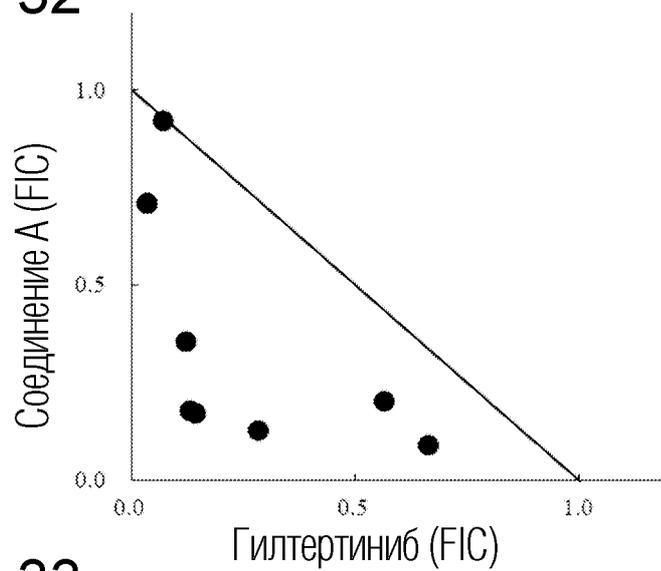
ФИГ. 30



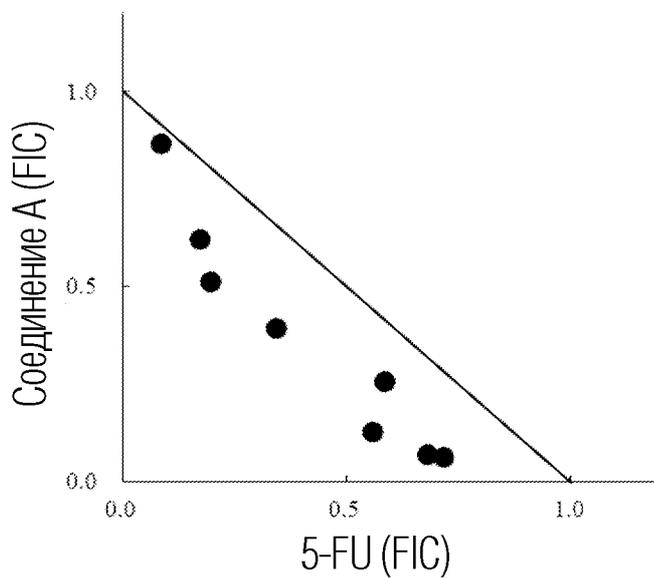
ФИГ. 31



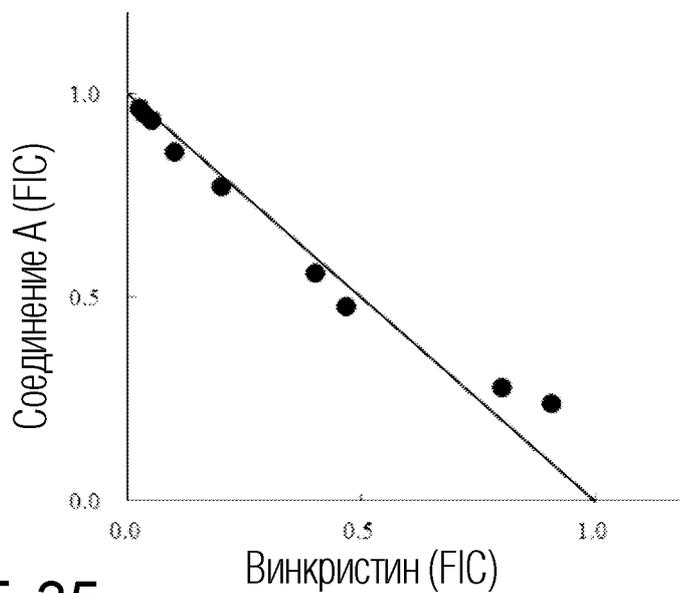
ФИГ. 32



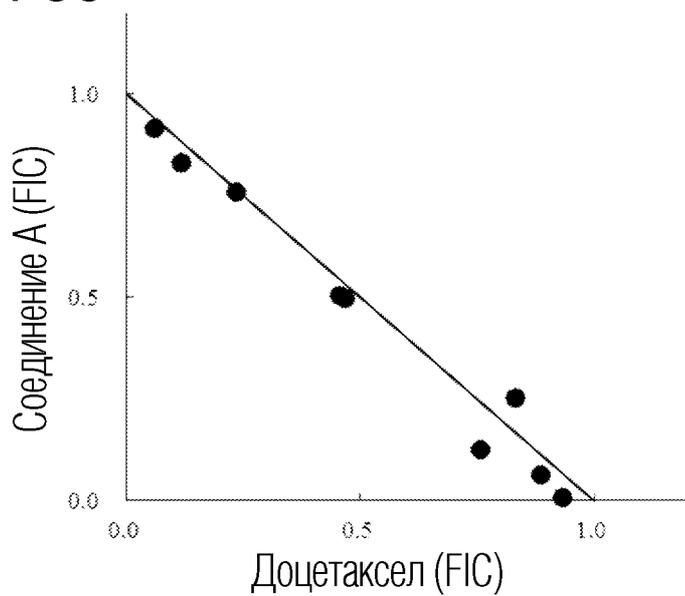
ФИГ. 33



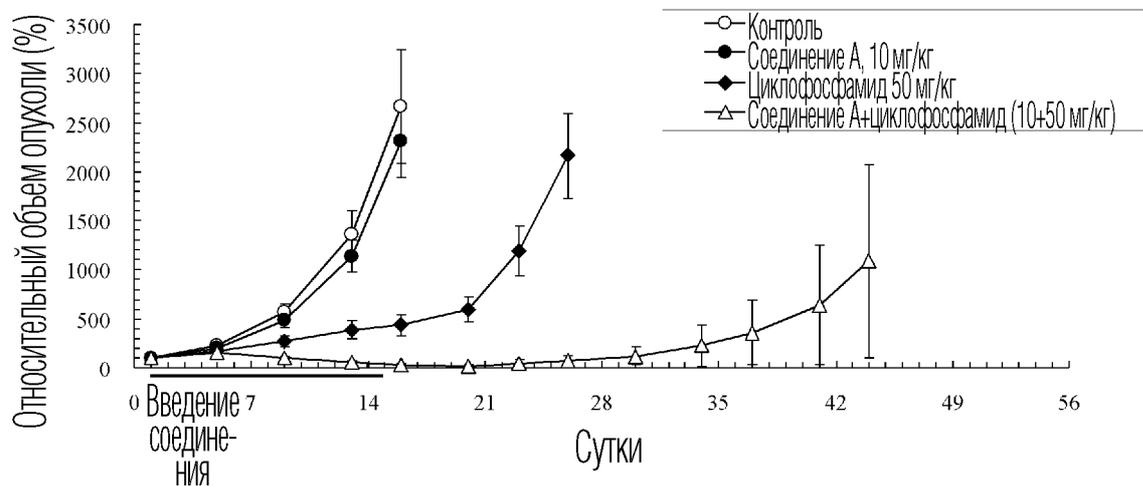
ФИГ. 34



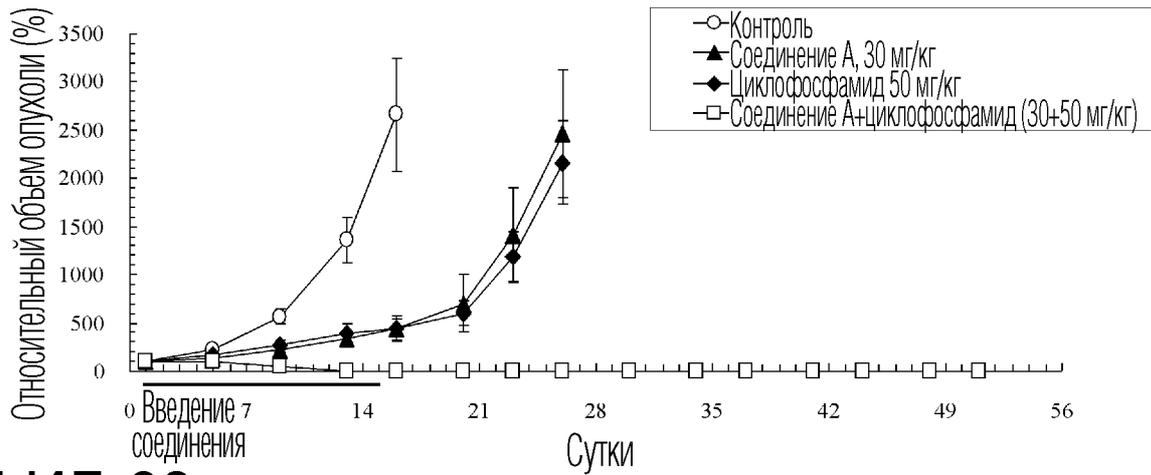
ФИГ. 35



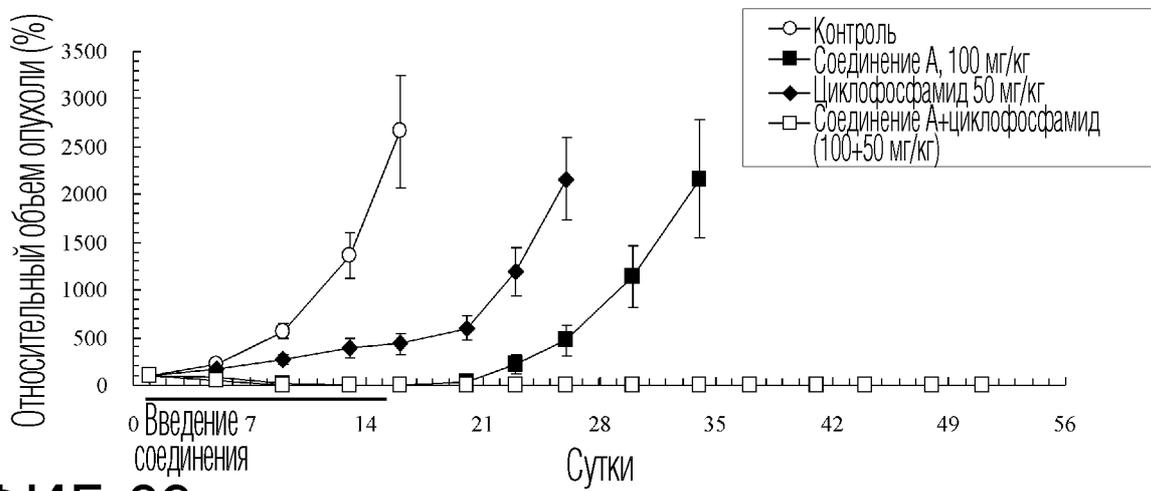
ФИГ. 36



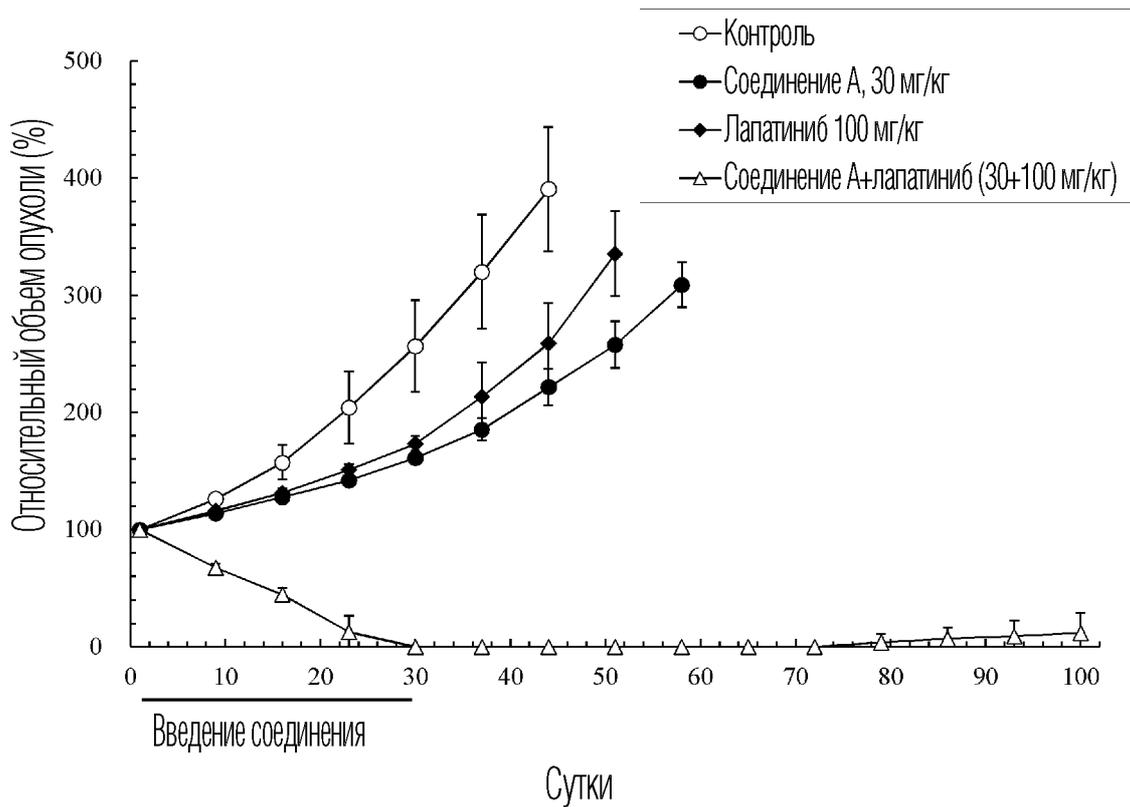
ФИГ. 37



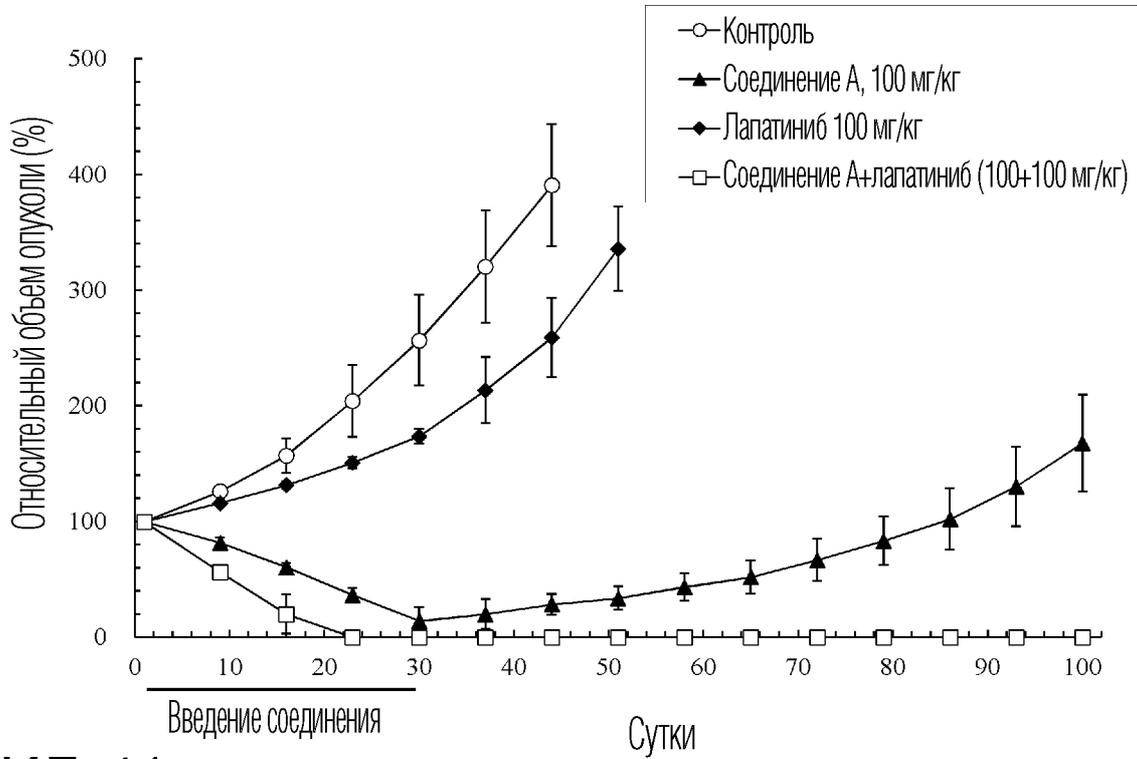
ФИГ. 38



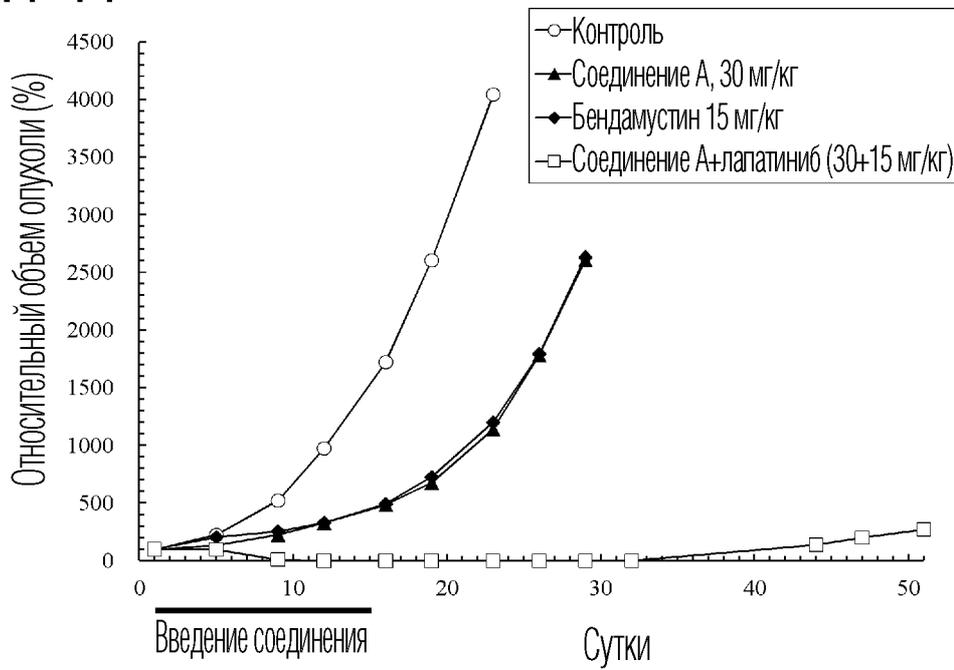
ФИГ. 39



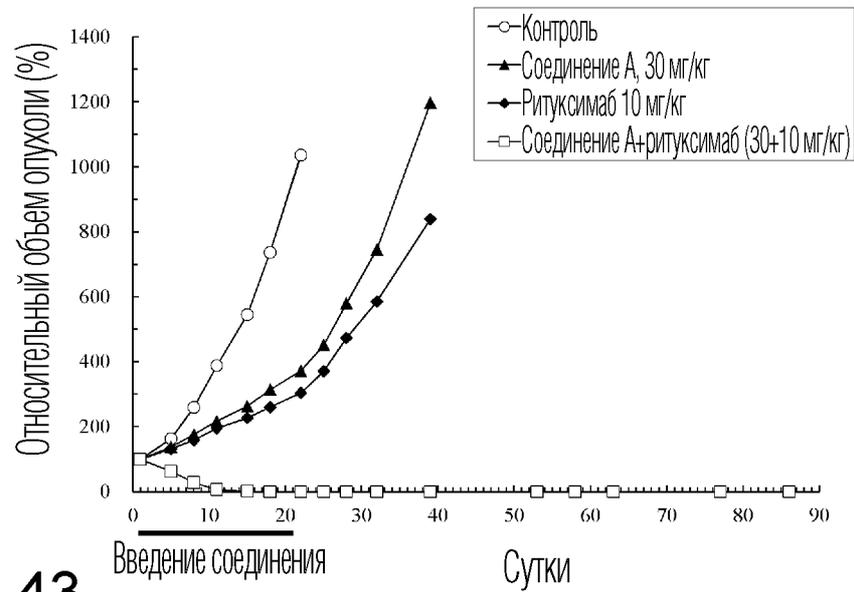
ФИГ. 40



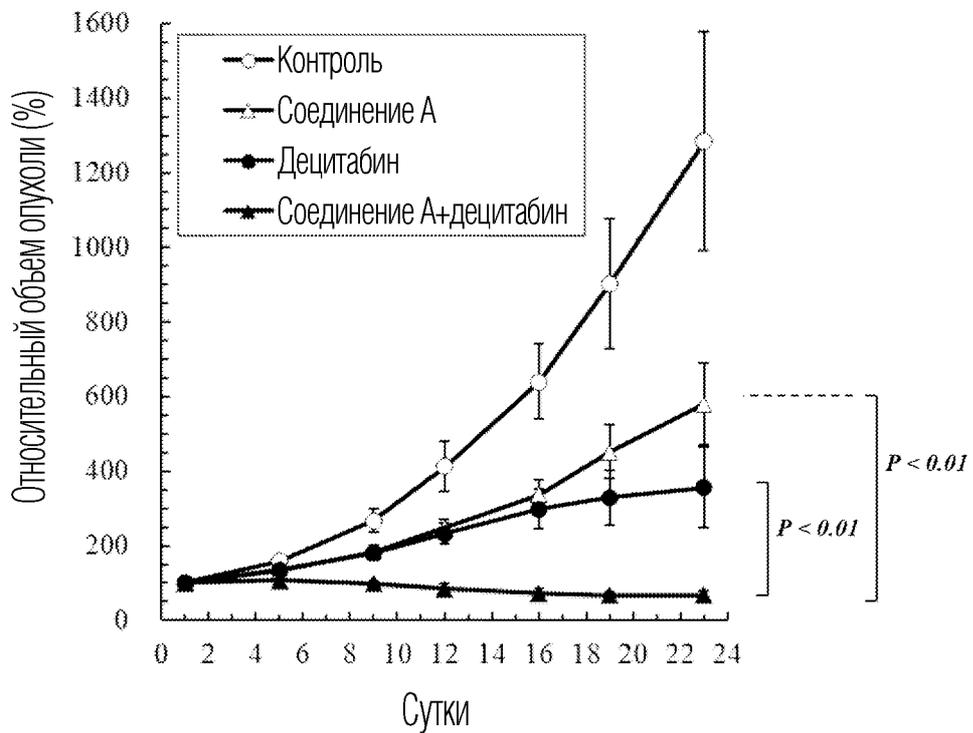
ФИГ. 41



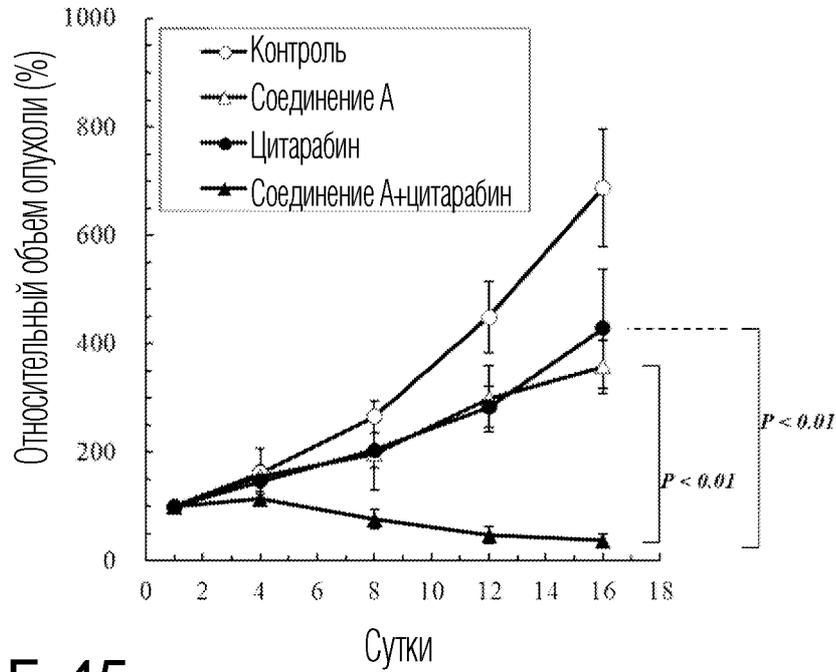
ФИГ. 42



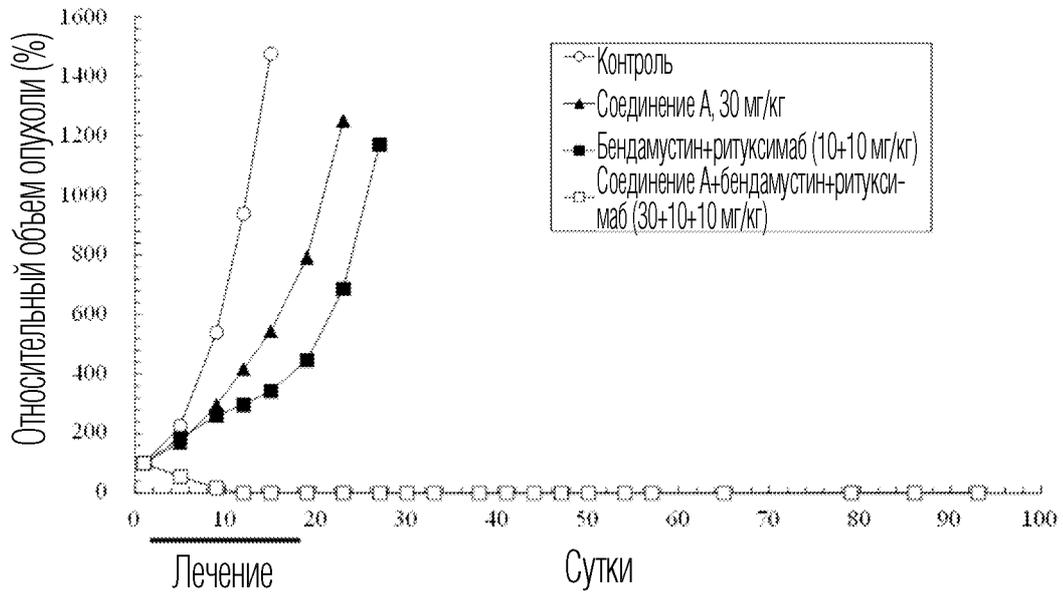
ФИГ. 43



ФИГ. 44



ФИГ. 45



ФИГ. 46

