

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291140 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.29

(51) Int. Cl. A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.23

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/926055

(32) 2019.10.25

(33) US

(86) PCT/EP2020/079856

(87) WO 2021/078925 2021.04.29

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

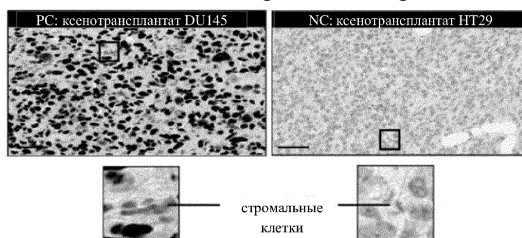
(72) Изобретатель:

Лео Элизабетта, Уинклер Клодия,
О'Коннор Марк Джеймс, Джонс
Джемма Николь, Пирс Эндрю Джеймс
(GB)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении раскрыты способы лечения рака комбинацией ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК, у пациентов с SLFN11-дефицитными раковыми клетками.



A1

202291140

202291140

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] Настоящее изобретение в целом относится к способам лечения рака.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] WEE1 представляет собой ядерную киназу, принадлежащую к семейству серин/треониновых протеинкиназ. WEE1 ингибирует циклинзависимые киназы (CDK) путем фосфорилирования CDK в двух разных сайтах (Tyr15 и Thr14). Таким образом, WEE1 играет роль в регуляции входа в митоз и инициации репликации ДНК, регуляции размера клеток и контрольных точек повреждения ДНК. Ингибиторы WEE1 были протестированы для лечения рака в качестве монотерапии и в сочетании с другими способами лечения рака.

[003] Schlafen 11 (SLFN11) принадлежит к семейству белков Schlafen и экспрессируется только у людей и некоторых приматов. Было показано, что инактивация SLFN11 в раковых клетках приводит к устойчивости к противоопухолевым средствам, которые вызывают повреждение ДНК и стресс репликации. Таким образом, SLFN11 является детерминантой чувствительности к различным классам ДНК-повреждающих средств и ингибиторов PARP. См. Zoppoli et al., PNAS 2012; 109: 15030-35; Murai et al., Oncotarget 2016; 7: 76534-50; Murai et al., Mol. Cell 2018; 69: 371-84.

[004] Разработан и одобрен ряд способов лечения рака. Однако некоторые способы лечения рака эффективны только у части пациентов. Более того, часть больных раком становится устойчивой к определенным видам лечения рака. Таким образом, существует потребность в способах выявления пациентов, которые реагируют на лечение рака, чтобы лечение можно было нацелить на соответствующих пациентов. Кроме того, существует потребность в способах устранения резистентности к лечению рака, наблюдаемой у некоторых пациентов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[005] Вышеуказанные потребности удовлетворяются описанными здесь способами. В частности, в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) отбор пациента с диагнозом рак; б) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными; и с) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[006] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых

клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых; и с) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, совместное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[007] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и с) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.

[008] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, который устойчив к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными ; и б) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[009] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, который устойчив к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессией SLFN11 клетками, отличными от раковых; и, б) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, совместное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и, б) если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.

[0011] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации *in situ*, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR), микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной

специфичной к метилированию полимеразной цепной реакции (Q-MSP). В конкретном варианте осуществления уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии.

[0012] В некоторых вариантах осуществления раскрытых в данном документе способов рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичников, меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака головного мозга, рака позвоночника, рака пищевода, рака щитовидной железы, рака желудка, рака желчного пузыря, рака печени, хориокарциномы, рака тела матки, рака шейки матки, рака почки, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака кожи, нейробластомы, остеосаркомы, саркомы Юинга, лейкоза, лимфомы Ходжкина, острого миелоидного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и рака головы и шеи.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, средство, повреждающее ДНК, выбрано из группы, состоящей из гемцитабина, этопозида, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, пикоплатина, метотрексата, доксорубицина, даунорубицина, 5-фторурацила, иринотекана, митомицина, темозоломида, топотекана, камптотецина, эпирубицина, идарубицина, трабектедина, капецитабина, бендамустина, флударабина, гидроксимочевины, трастузумаба, дерукстекана и их фармацевтически приемлемых солей.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, ингибитор WEE1 представляет собой адавосертиб или его фармацевтически приемлемую соль.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0015] На ФИГ. 1А показано положительное и отрицательное окрашивание в результате иммуногистохимического анализа (ИHC) SLFN11 в ткани ксенотрансплантата DU145 (SLFN11-профицитный) и ткани ксенотрансплантата HT29 (SLFN11-дефицитный) соответственно.

[0016] На ФИГ. 2А показаны иммуноблоты для SLFN11 и GAPDH в SLFN11 дикого типа (WT) и нокаутных (KO) изогенных клетках DU145. KO 1 и KO 2 были двумя разными клонами CRISPR-KO.

[0017] На ФИГ. 2В показаны значения синергизма (Loewe), полученные в результате обработки клеточных линий DU145 дикого типа SLFN11 (WT) или нокаутных по SLFN11 (KO1 и KO2) комбинацией гемцитабина (Gem.) и адавосертиба.

[0018] На ФИГ. 2С показаны значения синергизма (Loewe), полученные в результате обработки клеточных линий DU145 дикого типа SLFN11 (WT) или нокаутных по SLFN11 (KO1 и KO2) этопозидом (ETP) и адавосертибом.

[0019] На ФИГ. 2D показаны кривые выживаемости при введении указанных средств, повреждающих ДНК (гемцитабин, этопозид, камптотецин, цисплатин и гидроксимочевина), в отсутствие или в присутствии 0,36 мкМ адавосертиба в изогенных клетках DU145.

[0020] На ФИГ. 3А показаны значения $\log IC_{50}$ для монотерапии гемцитабином на панели клеточных линий поджелудочной железы, которые являются либо SLFN11-дефицитными, либо SLFN11-профицитными.

[0021] На ФИГ. 3В показаны значения $\log IC_{50}$ для монотерапии адавосертибом на панели клеточных линий поджелудочной железы, которые являются либо SLFN11-дефицитными, либо SLFN11-профицитными.

[0022] На ФИГ. 3С показаны значения синергизма для комбинации гемцитабина и адавосертиба на панели клеточных линий поджелудочной железы, которые являются либо SLFN11-дефицитными, либо SLFN11-профицитными.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0023] Хотя в данном документе показаны и описаны варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления предоставлены только в качестве примера. Для специалистов в данной области техники будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены, не выходящие за рамки настоящего изобретения. Следует понимать, что можно использовать различные альтернативы вариантам осуществления, описанным в данном документе. Используемые в данном документе заголовки разделов служат только в организационных целях и не должны пониматься как ограничивающие описываемый объект.

Определения

[0024] Термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" и другие грамматические эквиваленты, применяемые в данном документе, предусматривают ослабление, смягчение или уменьшение выраженности заболевания или состояния или одного или нескольких их симптомов, уменьшение выраженности основных метаболических причин симптомов, подавление заболевания или состояния, облегчение заболевания или состояния, обеспечение регрессии заболевания или состояния, облегчение состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или устранение симптомов заболевания или состояния.

[0025] Термины "вводить", "осуществление введения", "введение" и их грамматические эквиваленты, применяемые в данном документе, относятся к способам, применяемым для доставки фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, к требуемому участку биологического действия.

[0026] Термины «совместно вводимый», «совместное введение», «введение в комбинации с» и их грамматические эквиваленты, применяемые в данном документе, предназначены для охвата введения активных средств одному индивидууму и, если не указано иное, предусматривают схемы лечения, в которых средства вводятся одним и тем же или различными путями введения или в один и тот же или разные моменты времени. Они предусматривают одновременное введение в отдельных композициях, введение в разные моменты времени в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют одно или несколько активных средств.

[0027] Термин «фармацевтически приемлемый», применяемый в данном документе, относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не нейтрализует биологическую активность или свойства активного средства и является относительно нетоксичным, т. е. материал можно вводить индивидууму, не вызывая при этом нежелательных биологических эффектов или отрицательного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[0028] Термин «фармацевтически приемлемая соль», применяемый в данном документе, относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность форм свободных кислоты и основания активного средства и которые не являются нежелательными с биологической или какой-либо иной точек зрения. Активные средства могут реагировать с неорганическими или органическими основаниями или неорганическими или органическими кислотами с образованием фармацевтически приемлемой соли. Эти соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки или отдельно путем взаимодействия очищенных соединений с подходящим неорганическим или органическим основанием или неорганической или органической кислотой и выделения образованной таким образом соли.

[0029] Термины «пациент», «субъект» и «индивидуум» применяются в данном документе взаимозаменяемо. Применяемые в данном документе термины относятся к людям, страдающим раком.

[0030] Применяемый в данном документе термин «уровень экспрессии SLFN11 составляет» некоторую величину, например, 0% означает, что заявленное количество раковых клеток в раковой ткани пациента экспрессирует SLFN11. Точно так же, как применяемый в данном документе, термин «уровень экспрессии SLFN11 составляет

меньше» некоторой величины, например, 10% означает, что меньше указанного количества раковых клеток в раковой ткани пациента экспрессируют SLFN11.

[0031] Термин «SLFN11-дефицитный», применяемый в данном документе, относится к уровню экспрессии SLFN11 у соответствующего пациента, животного, ткани, клетки и т. д., который недостаточен для проявления нормального фенотипа, связанного с геном, или для проявления белком его физиологической функции. В контексте доклинических моделей клетки или животные, у которых ген SLFN11 нокаутирован (KO), являются примерами «SLFN11-дефицитных».

[0032] Термин «SLFN-11-профицитные», применяющийся в данном документе, относится к уровню экспрессии SLFN11 у соответствующего пациента, животного, ткани, клетки и т. д., который достаточен для проявления нормального фенотипа, связанного с геном, или для белка для проявления своей физиологической функции. В контексте доклинических моделей клетки или животные, у которых ген SLFN11 экспрессируется на нормальных уровнях, т.е. клетки или животные дикого типа (WT), являются примерами «SLFN11-профицитных».

Способы лечения

[0033] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными; и, с) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[0034] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых; и с) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, совместное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и с) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 25%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах

осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и с) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 20%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и с) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 15%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, включающий а) выбор пациента, у которого диагностирован рак; б) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и с) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 9%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 8%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 7%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 6%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 5%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 4%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 3%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 2%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 1%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, который устойчив к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными ; и б) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, раскрыт способ лечения рака у пациента, который устойчив к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессией SLFN11 клетками, отличными от раковых; и, б) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, совместное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки пациента не экспрессируют SLFN11.

[0038] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента; и, б) если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 25%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента; и, б) если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 20%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента; и, б) если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 15%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий а) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента; и, б) если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 9%. В

некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 8%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 7%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 6%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 5%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 4%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 3%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 2%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет меньше 1%. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1 и средство, повреждающее ДНК, вводят совместно, если уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.

[0039] В раскрытых в настоящем документе способах уровень экспрессии SLFN11 можно определить любым подходящим способом, известным специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SLFN11 определяется уровнем транскрипта мРНК или гиперметилованием промотора ДНК. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации *in situ*, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR), микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной специфичной к метилированию полимеразной цепной реакции (Q-MSP). В конкретном варианте осуществления уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии (ИНС).

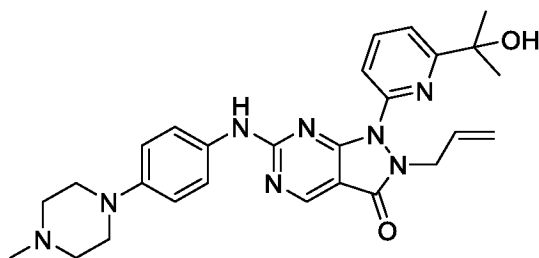
Заболевания

[0040] Описанные здесь способы применимы для лечения различных видов рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичников, меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака головного мозга, рака позвоночника, рака пищевода,

рака щитовидной железы, рака желудка, рака желчного пузыря, рака печени, хориокарциномы, рака тела матки, рака шейки матки, рака почки, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака кожи, нейробластомы, остеосаркомы, саркомы Юинга, лейкоза, лимфомы Ходжкина, острого миелоидного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и рака головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников, устойчивый к препаратам платины. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

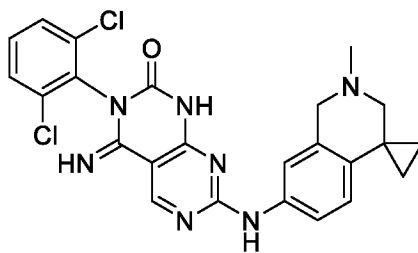
Ингибиторы WEE1

[0041] Адавосертиб имеет химическое название 2-аллил-(1-[6-(1-гидрокси-1-метилэтил)пириндин-2-ил]-6-{[4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил]амино}-1,2-дигидро-3Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-он и следующую химическую структуру:



[0042] Активность адавосертиба как ингибитора WEE1, применение при лечении различных видов рака и синтез описаны в патенте США №7834019. Различные кристаллические формы адавосертиба описаны в патентах США №8703779 и №8198281. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1, вводимый способами, описанными в настоящем документе, представляет собой адавосертиб или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1, вводимый способами, описанными в настоящем документе, представляет собой адавосертиб.

[0043] 3-(2,6-Дихлорфенил)-4-имино-7-[(2'-метил-2',3'-дигидро-1'H-спиро[циклопропан-1,4'-изохинолин]-7'-ил)амино]-3,4-дигидропиримидо[4,5-d]пиримидин-2(1H)-он представляет собой ингибитор WEE1 со следующей химической структурой:



[0044] Активность 3-(2,6-дихлорфенил)-4-имино-7-[(2'-метил-2',3'-дигидро-1'H-спиро[циклопропан-1,4'-изохинолин]-7'-ил)амино]-3,4-дигидропиримидо[4,5-d]пиримидин-2(1H)-она в качестве ингибитора WEE1, его применение при лечении рака и синтез описаны в патенте США №8436004. В некоторых вариантах осуществления ингибитор WEE1, вводимый способами, описанными в настоящем документе, представляет собой 3-(2,6-дихлорфенил)-4-имино-7-[(2'-метил-2',3'-дигидро-1'H-спиро[циклопропан-1,4'-изохинолин]-7'-ил)амино]-3,4-дигидропиримидо[4,5-d]пиримидин-2(1H)-он.

Средства, повреждающие ДНК

[0045] Используемый в данном документе термин «средство, повреждающее ДНК» или «DDA» представляет собой средство для лечения рака, действие которого основано на повреждении ДНК раковых клеток. DDA действуют с помощью различных механизмов, включая перекрестное связывание ДНК, вмешательство в репликацию ДНК и ингибирование синтеза ДНК. Неограничивающие примеры DDA, которые можно использовать в способах, описанных в настоящем документе, включают гемцитабин, этопозид, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, пикоплатин, метотрексат, доксорубин, даунорубин, 5-фторурацил, иринотекан, митомицин, темозоломид, топотекан, камптотецин, эпирубин, идарубин, трабектедин, капецитабин, бендамустин, флударабин, гидроксимочевину, трастузумаб дерукстекан и их фармацевтически приемлемые соли.

Виды комбинированной терапии

[0046] В некоторых вариантах осуществления ингибиторы WEE1 и DDA, вводимые совместно в раскрытых в данном документе способах, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными способами лечения рака. Врач может определить одно или несколько дополнительных противораковых средств для совместного введения пациенту в зависимости от конкретных характеристик пациента и рака, подлежащего лечению. Одно или несколько дополнительных противораковых средств можно вводить одновременно с введением ингибитора WEE1 и DDA, до или после него в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных противораковых

средств выбраны из ионизирующего излучения, средств, взаимодействующих с тубулином, ингибиторов белка веретена кинезина, ингибиторов контрольной точки веретена, ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимеразы, ингибиторов матриксных металлопротеиназ, ингибиторов протеаз, ингибиторов протеасом, Bcl-2-ингибиторов, модуляторов белков теплового шока, ингибиторов гистондеацетилазы, антиэстрогенов, селективных модуляторов рецепторов эстрогенов, антиандрогенов, агонистов LHRH, ингибиторов 5 α -редуктазы, ингибиторов лиазы цитохрома P450 C17, ингибиторов ароматазы, ингибиторов киназы EGFR, двойных ингибиторов erbB1 и erbB2, ABL ингибиторов киназы, ингибиторов VEGFR-1, ингибиторов VEGFR-2, ингибиторов Plks, ингибиторов киназы аутоа, ингибиторов JAK, ингибиторов c-MET киназы, ингибиторов циклинзависимой киназы, ингибиторов PI3K и ингибиторов mTOR.

ПРИМЕРЫ

[0047] Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют и поясняют настоящее изобретение и не ограничивают каким-либо образом объем формулы изобретения.

Пример 1. Разработка анализа FFPE ИHC, специфичного в отношении SLFN11, и характеристика клеточных линий DU145 SLFN11 KO.

Способы

[0048] Нокаут SLFN11 в клетках рака предстательной железы DU145 был выполнен с помощью CRISPR/Cas9. sgRNAs, нацеленные на SLFN11 в экзоне 4 (GCGTTCCATGGACTCAAGAGAGG, мотив, прилегающий к протоспейсеру, выделен жирным шрифтом), были разработаны с помощью собственного программного обеспечения CRISPR3, синтезированы с помощью Integrated DNA Technology (IDT) и клонированы в вектор, содержащий CAS9 и кассету GFP (azPGE02-Cas9-T2A- GFP). Затем этот вектор трансфицировали в клетки рака предстательной железы DU145 с использованием липофектамина 3000 (ThermoFisher Scientific). Через 48 часов пулы клеток с наивысшей экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP) сортировали по отдельности в 96-луночные планшеты. Клоны, утратившие аллель дикого типа, размножали для получения клеточных линий из отдельных клонов. Два SLFN11-дефицитных клон были профилированы и отобраны для фармакологических исследований (клон KO1 и клон KO2). Лизаты клеток от SLFN11-профицитных (wt) и от SLFN11-дефицитных (KO1 и KO2) получали и анализировали с помощью стандартного иммуноблоттинга SDS-PAGE. Антитела, используемые для выявления методом иммуноблоттинга, представляли собой: антитело к SLFN11 (ab121731, 1:1000, Abcam) и, в качестве контроля загрузки, антитело к GAPDH (14C10, 1:2000, CST).

[0049] Ксенотрансплантаты DU145 (SLFN11-профицитные) и HT29 (SLFN11-дефицитные) выращивали в соответствии с Глобальной политикой AstraZeneca в области биоэтики, законодательством Министерства внутренних дел Великобритании и Законом о научных процедурах для животных 1986 г. (ASPA). Иммуногистохимию SLFN11 проводили на опухолевых срезах толщиной 4 мкм фиксированных формалином тканей, залитых парафином, и проводили на Bond RX (Leica Microsystems) с использованием извлечения антигена ER1. Предметные стекла окрашивали первичным кроличьим поликлональным антителом к SLFN11 (Abcam, ab121731) в концентрации 0,5 мкг/мл для срезов ткани ксенотрансплантата и в концентрации 2,5 мкг/мл для срезов тканей человека. Цифровые слайды были получены с помощью сканера Aperio AT2 (Leica) с объективом 20х.

Результаты

[0050] Иммуногистохимия SLFN11 SLFN11-положительной ткани DU145 и SLFN11-негативной ткани HT29 подтвердила соответствующее присутствие и отсутствие SLFN11 в этих двух моделях (ФИГ. 1А).

Пример 2. Устойчивость к DDA в клетках DU145 SLFN11 KO можно обратить путем комбинированной обработки ингибитором WEE1.

Способы

[0051] Адавосертиб был синтезирован в AstraZeneca. Гемцитабин, цисплатин, гидроксимочевина (HU) и этопозид были получены от Tocris, а камптотецин - от Sigma. Исходные растворы гемцитабина (50 mM), цисплатина (1,67 mM) и HU (1 M) получали в водном растворе; все остальные препараты растворяли в концентрации 10 mM в диметилсульфоксиде (ДМСО) (10 mM).

[0052] Изогенные клетки DU145 (WT и SLFN11 KO) высевали в 384-луночные планшеты и оставляли отстаиваться в течение ночи. На ФИГ. 2А показаны иммуноблоты для изогенных клеток SLFN11 WT и KO DU145, использованных в экспериментах. KO 1 и KO 2 были двумя разными клонами CRISPR-KO. В клетки вводили растворы соединений в матрице концентрации 6х6 с верхними дозами 3 мкм адавосертиба, 0,1 мкм гемцитабина и 1 мкм этопозид с использованием Echo 555 (LabCyte). Через пять дней после непрерывного лечения жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа живой-мертвой, с использованием SYTOX Green (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США). Количество живых клеток рассчитывали путем вычитания мертвых и общих прочтений. Используя эту методологию, количество клеток на лунку также определяли в момент обработки (день 0). Данные показаны с использованием уравнения $[1-(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ для значений, для которых $Ti \geq Tz$, и $[1-(Ti-Tz)/Tz] \times 100$ для

концентраций, для которых $T_i < T_z \times 100$, где T_i = клетки, обработанные соединением; T_z = клетки в момент времени 0 часов и C = контрольные клетки. Это дает шкалу числа живых клеток от 0 до 200%, где 0-100% представляет ингибирование роста, а 100-200% представляет гибель клеток.

[0053] Комбинированную активность (синергизм) рассчитывали с использованием модели дозоаддитивности Loewe в программном обеспечении Genedata Screener (Genedata, Базель, Швейцария). Эта модель рассчитывает ожидаемый результат, если эффекты двух соединений были аддитивными на основе двух монотерапевтических средств. Оценка превышения отражает то, насколько результат эксперимента превышает предсказанный аддитивный эффект. Программа обеспечивает оценку синергии для комбинации, которая отражает как силу оценки превышения, так и зависимость от дозы. Результат больше 5 считается синергетическим.

[0054] Для эксперимента по выживанию клеток в 96-луночном планшете клетки высевали в 96-луночный планшет после дозирования соединения с помощью дозатора HP. Через 72 часа жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентных анализов конечной точки CellTiter-Glo (Promega). Процентный рост рассчитывали по уравнению $(T-T_0)/(C-T_0) \times 100$, где T = клетки, обработанные соединением; T_0 = клетки в момент времени 0 часов и C = контрольные клетки. Кривые доза-эффект были построены на призме GraphPad.

Результаты

[0055] Комбинированное лечение адавосертибом и гемцитабином или этопозидом последовательно приводило к более высоким показателям синергизма в клетках SLFN11 KO по сравнению с клетками дикого типа, SLFN11-профицитными клетками (ФИГ. 2B и 2C соответственно). Более высокие показатели синергизма указывают на то, что комбинированное лечение ингибитором WEE1 и DDA более эффективно в отношении клеток SLFN11 KO по сравнению с клетками дикого типа по сравнению с эффектом монотерапии любым средством. Комбинированный синергетический эксперимент был подтвержден форматами анализа с более низкой пропускной способностью. Результаты показаны на ФИГ. 2D для комбинации различных указанных DDA (гемцитабин, этопозид, камптотецин, цисплатин и гидроксимочевина) с адавосертибом. Во всех случаях клетки SLFN11 KO (пунктирные серые линии) оказались более устойчивыми к каждому из DDA по сравнению с клетками дикого типа (непрерывные серые линии). Комбинация DDA с адавосертибом не добавляла значительного антипролиферативного эффекта в SLFN11-профицитных клетках (сплошные черные линии). Однако в клетках SLFN11 KO те же комбинации приводили к значительному сдвигу кривой по сравнению с монотерапией

DDA в SLFN11-дефицитных клетках (показаны пунктирной черной линией), подтверждая, что эти клетки могут быть полностью повторно сенсibilизированы к лечению DDA путем совместного введения адавосертиба.

Пример 3. Устойчивость к гемцитабину в клеточных линиях с дефицитом SLFN11 можно обратить вспять путем комбинированного лечения с ингибитором WEE1.

Способы

[0056] Данные секвенирования РНК SLFN11 (значения $\log_2$ RPKM) были загружены из энциклопедии линий раковых клеток (CCLE) (Barretina J. et al., Nature, 2012; 483: 603-607) и данные о лекарственной реакции ($\log(\text{IC}_{50})$ и площадь под кривой доза-реакция (AUC)) из базы данных о чувствительности к лекарственным средствам (Yang W et al., Nucleic Acids Res, 2013; 41: D955-61). Клеточные линии со значениями CCLE RNA seq $\log_2$ RPKM ниже 1 были определены как SLFN11-дефицитные, а клеточные линии со значениями $\log_2$ RPKM выше 1 — как SLFN11-профицитные. Девятнадцати линиям клеток поджелудочной железы в 384-луночных планшетах вводили возрастающие концентрации адавосертиба и гемцитабина в матрице концентрации 6x6 с использованием Echo 555 (LabCyte). Диапазон доз составлял 0-3 мкМ для адавосертиба и 0-0,3 мкМ для гемцитабина; в обоих случаях выполнялись разведения 1:3 от верхней дозы. Через пять дней после непрерывного лечения жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа живой-мертвый, с использованием SYTOX Green (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США). Синергизм анализировали в программном обеспечении для скрининга Genedata с использованием модели дозоаддитивности Loewe, как описано выше.

Результаты

[0057] Результаты, представленные в примере 2, были подтверждены на панели клеточных линий рака поджелудочной железы. На этой панели после лечения дозозависимой монотерапией гемцитабином SLFN11-дефицитные линии клеток были обнаружены в среднем в 100 раз менее чувствительными, чем SLFN11-профицитные клетки (ФИГ. 3А). SLFN11-дефицитные и SLFN11-профицитные линии раковых клеток поджелудочной железы показали одинаковую реакцию на монотерапию адавосертибом (ФИГ. 3В). Однако комбинированное лечение гемцитабином и адавосертибом было значительно более синергичным в SLFN11-дефицитных, чем в SLFN11-профицитных раковых клетках поджелудочной железы (ФИГ. 3С). Результаты показывают, что комбинированная терапия ингибитором WEE1 и DDA, как ожидается, будет более эффективной у пациентов с SLFN11-дефицитными раковыми клетками по сравнению с монотерапией ингибитором WEE1 или DDA.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у пациента, включающий
 - a) выбор пациента с диагнозом рак;
 - b) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными; и,
 - c) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК.
2. Способ лечения рака у пациента, включающий
 - a) выбор пациента с диагнозом рак;
 - b) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых; и,
 - c) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где раковые клетки пациента являются отрицательными в отношении экспрессии SLFN11.
4. Способ по любому из пп. 1-3, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации in situ, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR), микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной полимеразной цепной реакции, специфичной в отношении метилирования (Q-MSP).
5. Способ по любому из пп. 1-3, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии.
6. Способ лечения рака у пациента, включающий
 - a) выбор пациента с диагнозом рак;
 - b) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациентаи,
 - c) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 и средства, повреждающего ДНК.
7. Способ по п. 6, где уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.
8. Способ по п. 6 или п. 7, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации in situ, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR),

микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной полимеразной цепной реакции, специфичной в отношении метилирования (Q-MSP).

9. Способ по п. 6 или п. 7, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии.

10. Способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий

- a) определение того, являются ли раковые клетки пациента SLFN11-дефицитными; и,
- b) если раковые клетки пациента SLFN11-дефицитны, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 со средством, повреждающим ДНК.

11. Способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий

- a) определение того, является ли экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых; и,
- b) если экспрессия SLFN11 ниже в раковых клетках пациента по сравнению с экспрессирующими SLFN11 клетками пациента, отличными от раковых, совместное введение пациенту ингибитора WEE1 со средством, повреждающим ДНК.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где раковые клетки пациента являются отрицательными в отношении экспрессии SLFN11.

13. Способ по любому из пп. 10-12, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации in situ, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR), микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной полимеразной цепной реакции, специфичной в отношении метилирования (Q-MSP).

14. Способ по любому из пп. 10-12, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии.

15. Способ лечения рака у пациента с устойчивостью к лечению средством, повреждающим ДНК, включающий

- a) определение уровня экспрессии SLFN11 в раковых клетках пациента и,
- b) если уровень экспрессии SLFN11 меньше 10%, одновременное введение пациенту ингибитора WEE1 со средством, повреждающим ДНК.

16. Способ по п. 15, где уровень экспрессии SLFN11 составляет 0%.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии, масс-спектрометрии, гибридизации *in situ*, NanoString, количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR), микрочипового анализа, бисульфитного секвенирования или количественной полимеразной цепной реакции, специфичной в отношении метилирования (Q-MSP).

18. Способ по п. 15 или п. 16, где уровень экспрессии SLFN11 определяют с помощью иммуногистохимии.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где рак выбран из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака яичников, меланомы, рака легкого, колоректального рака, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака головного мозга, рака позвоночника, рака пищевода, рака щитовидной железы, рака желудка, рака желчного пузыря, рака печени, хориокарциномы, рака тела матки, рака шейки матки, рака почки, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака кожи, нейробластомы, остеосаркомы, саркомы Юинга, лейкоза, лимфомы Ходжкина, острого миелоидного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и рака головы и шеи.

20. Способ по любому из пп. 1-18, где рак представляет собой рак яичников.

21. Способ по любому из пп. 1-18, где рак представляет собой рак яичников, устойчивый к препаратам платины.

22. Способ по любому из пп. 1-18, где рак представляет собой рак эндометрия.

23. Способ по любому из пп. 1-18, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

24. Способ по любому из пп. 1-18, где рак представляет собой рак молочной железы.

25. Способ по любому из предыдущих пунктов, где средство, повреждающее ДНК, выбрано из группы, состоящей из гемцитабина, этопозиды, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, пикоплатина, метотрексата, доксорубина, даунорубина, 5-фторурацила, иринотекана, митомицина, темозоломида, топотекана, камптотецина, эпирубина, идарубина, трабектедина, капецитабина, бендамустина, флударабина, гидроксимочевины, трастузумаба дерукстекана и их фармацевтически приемлемых солей.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, где средство, повреждающее ДНК, выбрано из группы, состоящей из гемцитабина, этопозиды, камптотецина, цисплатина, гидроксимочевины и их фармацевтически приемлемых солей.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, где средство, повреждающее ДНК, представляет собой гемцитабин или его фармацевтически приемлемую соль.

28. Способ по любому из пп. 1-25, где средство, повреждающее ДНК, представляет собой трастузумаб дерукстекан.

29. Способ по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор WEE1 представляет собой адавосертиб или его фармацевтически приемлемую соль.

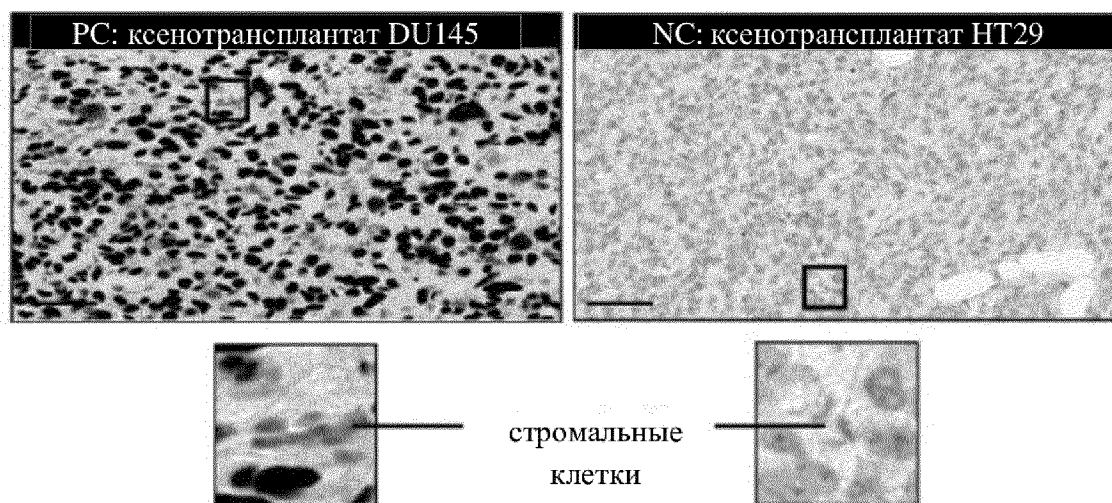
30. Способ по любому из пп. 1-24, где средство, повреждающее ДНК, представляет собой гемцитабин или его фармацевтически приемлемую соль, а ингибитор WEE1 представляет собой адавосертиб или его фармацевтически приемлемую соль.

31. Способ по любому из пп. 1-24, где средство, повреждающее ДНК, представляет собой трастузумаб дерукстекан, а ингибитор WEE1 представляет собой адавосертиб или его фармацевтически приемлемую соль.

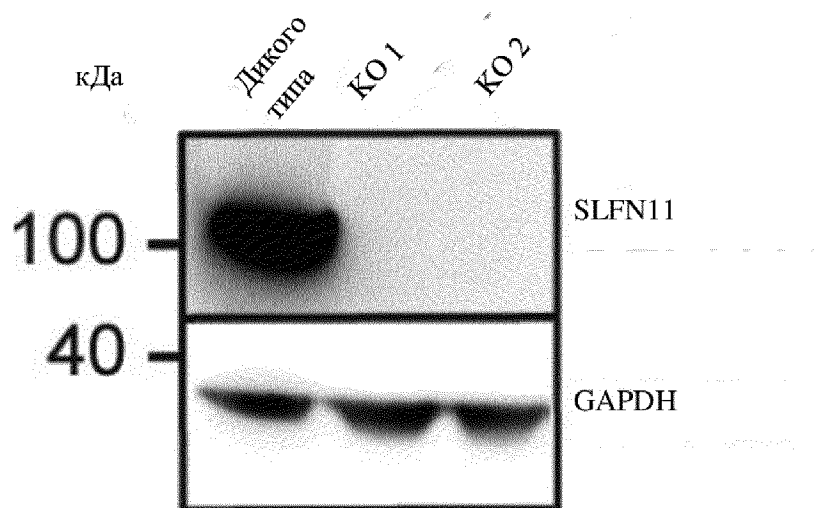
32. Способ по п. 30, где 175 мг адавосертиба вводят пациенту в дни 1, 2, 8, 9, 15 и 16, а гемцитабин или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту в дозе 800 мг/м^2 в дни 1, 8 и 15 в 28-дневном цикле.

33. Способ по п. 30, где 175 мг адавосертиба вводят пациенту в дни 1, 2, 8, 9, 15 и 16, а гемцитабин или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту в дозе 1000 мг/м^2 в дни 1, 8 и 15 в 28-дневном цикле.

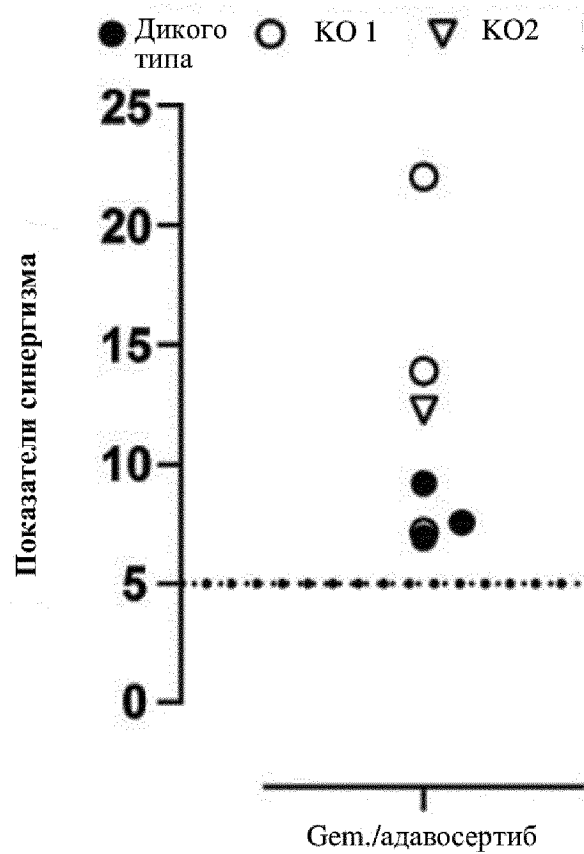
ФИГ. 1А



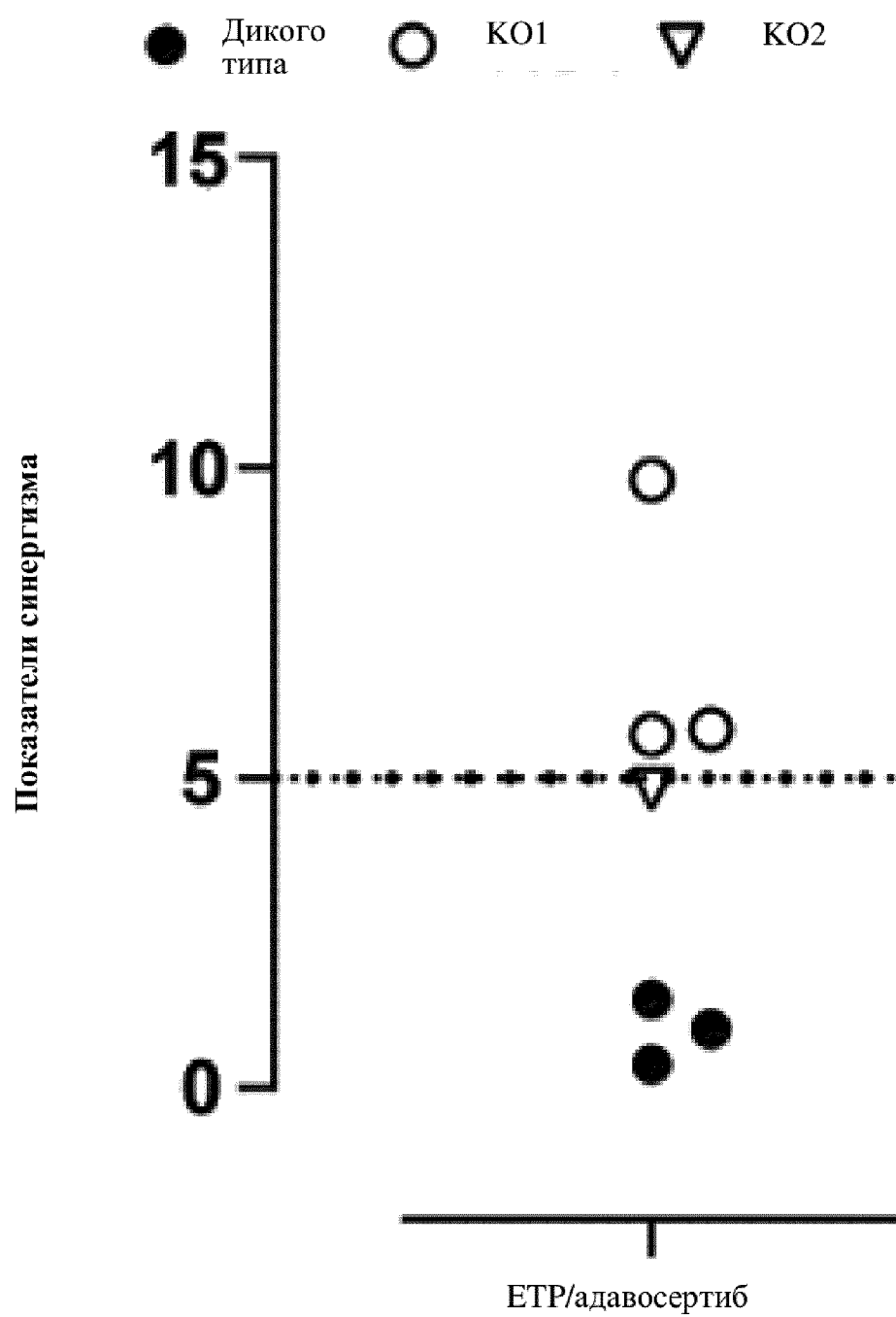
ФИГ. 2А



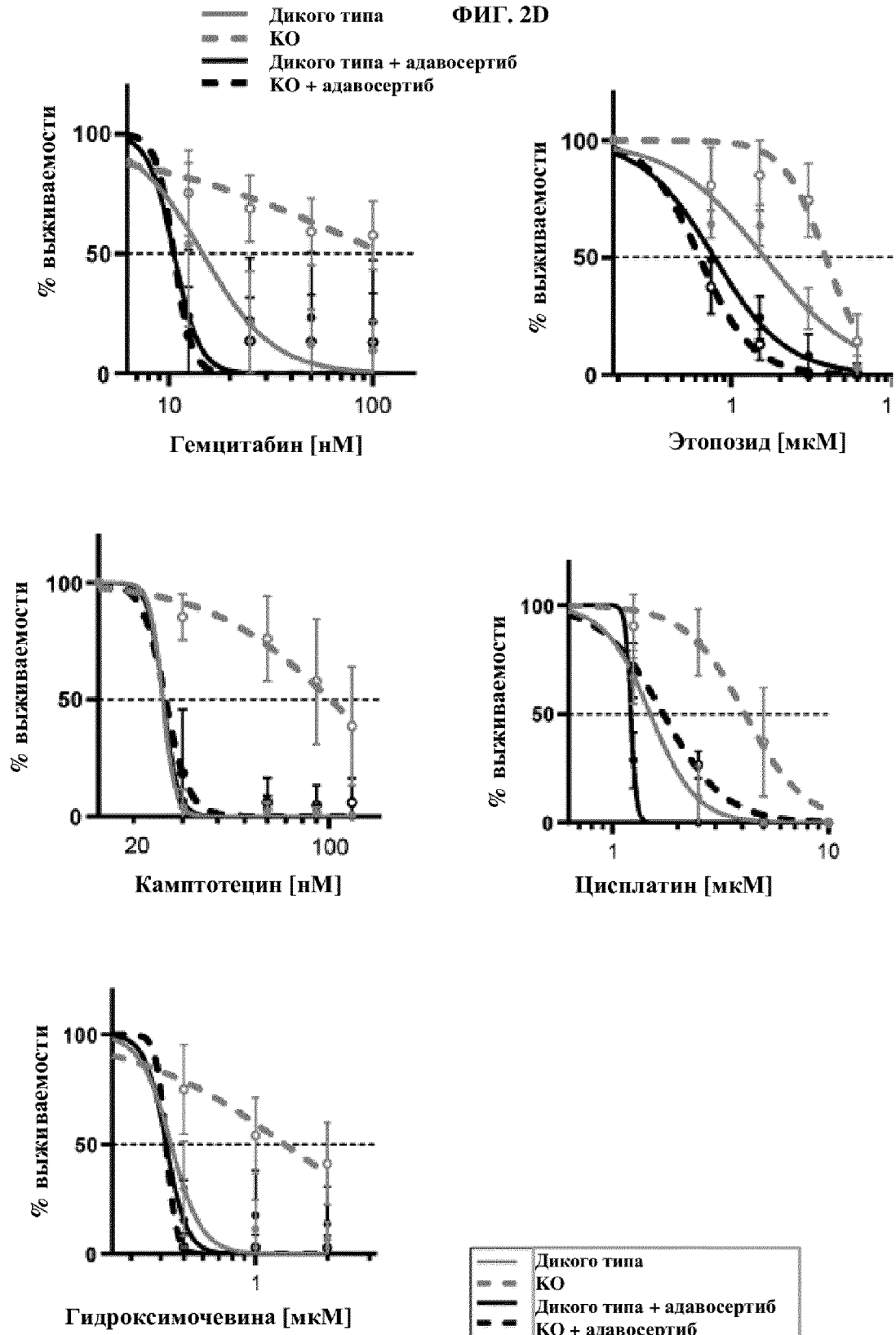
ФИГ. 2В



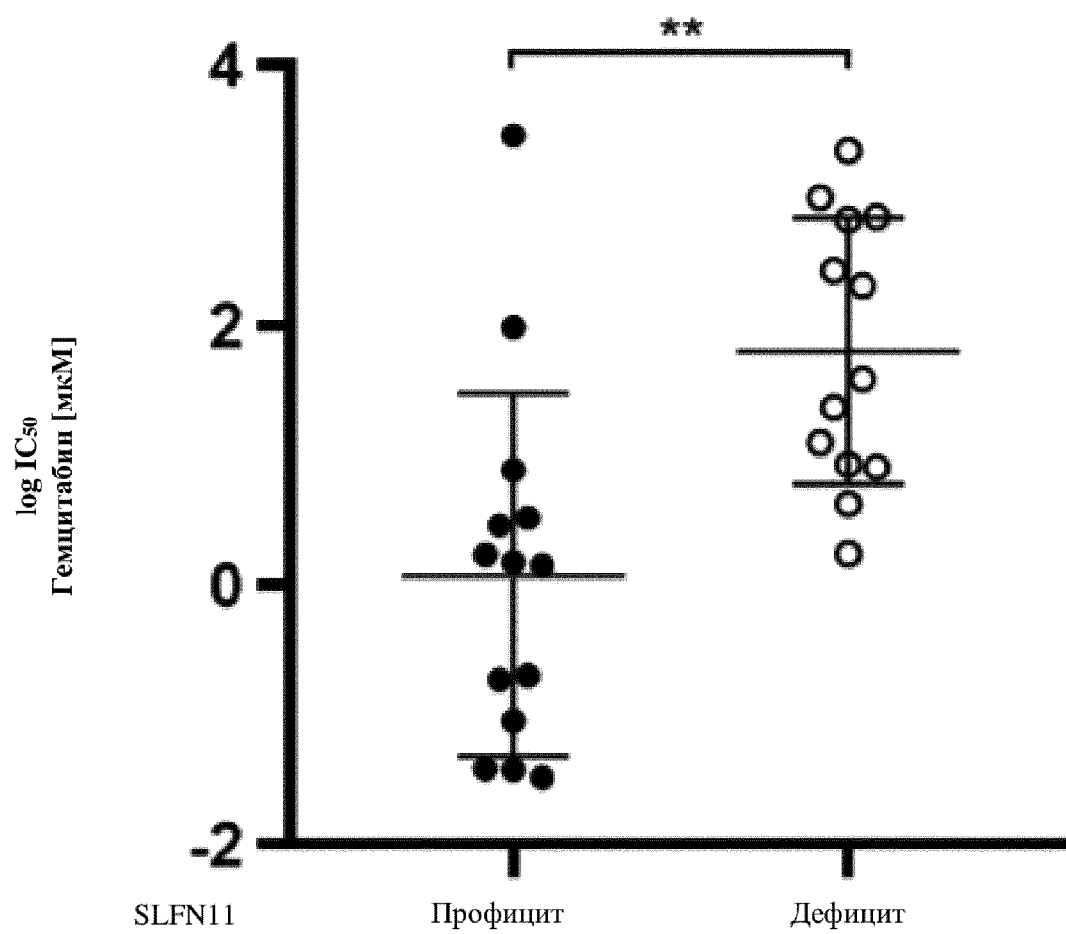
ФИГ. 2С



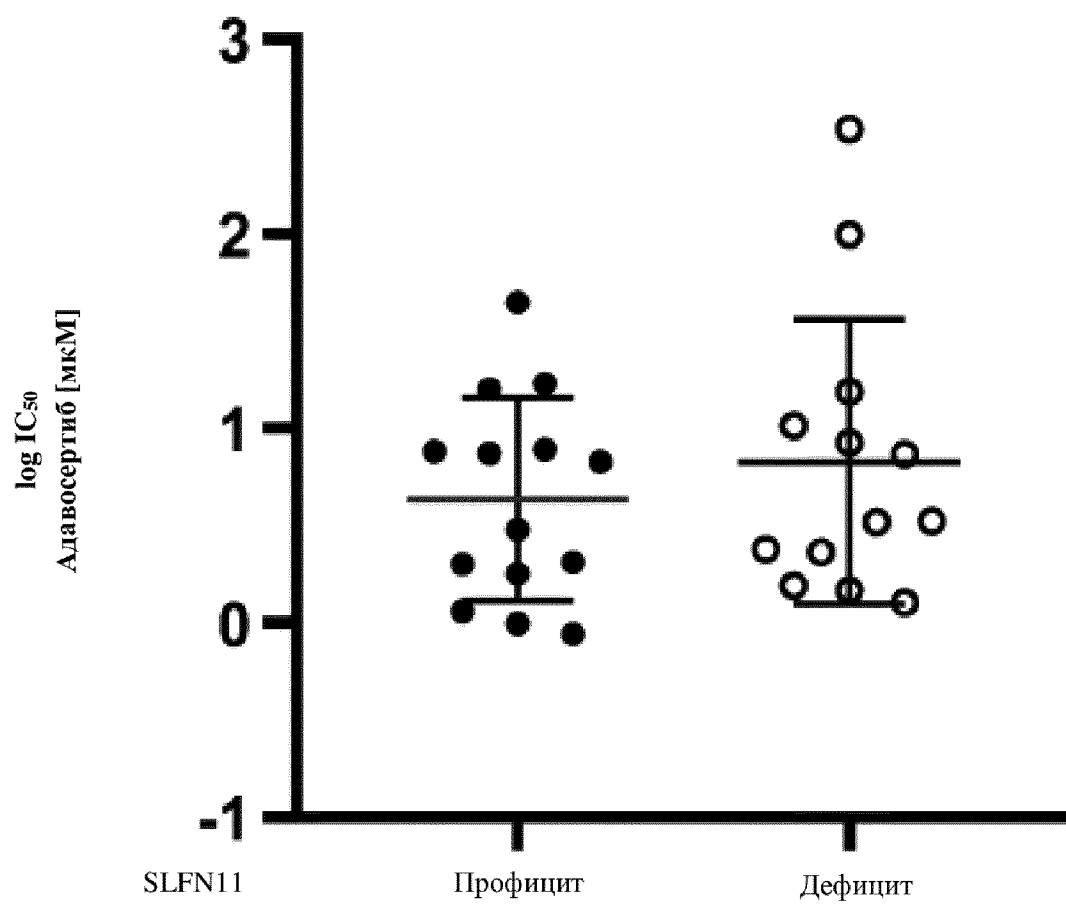
ФИГ. 2D



ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

