

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292469 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.16

(51) Int. Cl. *G01N 33/574* (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/7135 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/983,300

(32) 2020.02.28

(33) US

(86) PCT/US2021/019871

(87) WO 2021/173970 2021.09.02

(71) Заявитель:
ДЗЕ БРОД ИНСТИТУТ,
ИНК.; ДАНА-ФАРБЕР КЭНСЕР
ИНСТИТУТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Голуб Тодд Р., Цветков Питер (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены способы и композиции, относящиеся к лечению рака с использованием ионофоров меди.

202292469

A1

A1

202292469

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575641EA/071

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/983,300, поданной 28 февраля 2020 г.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Раковые клетки демонстрируют замечательную способность адаптироваться к цитотоксическим стрессорам и изменять пути гибели клеток, чтобы выжить. Первоначальная способность раковых клеток противостоять противораковой терапии связана со сдвигом метаболизма от гликолиза к усилению митохондриального метаболизма. Сдвиг к усилению митохондриального метаболизма связан с лекарственной резистентностью в нескольких моделях рака. Кроме того, это состояние лекарственной резистентности показывает повышенную уязвимость к ионофору меди, называемому элескломол. Элескломол связывает медь и способствует гибели клеток, и гибель клеток, вызванная элескломол, зависит от доступности как внутриклеточной, так и внеклеточной меди. Индукция гибели клеток под действием элескломол значительно усиливается, когда клетки переключаются с гликолиза на усиленный митохондриальный метаболизм. Недавно, множественные скрининги делеции генов на основе CRISPR/Cas9, сфокусированные на полном геноме и метаболическом гене, показали, что делеция генов пути липоевой кислоты и делеция гена, кодирующего митохондриальный белок ферредоксин 1 (FDX1), спасает клетки от гибели клеток, индуцированной элескломол. Генетический и биохимический анализ также показал, что FDX1 является важным вышестоящим регулятором пути липоевой кислоты и ключевым регулятором индукции гибели клеток ионофорами меди, такими как элескломол. Эти результаты проливают свет на роль меди и пути липоевой кислоты в продвижении перехода к усилению митохондриального метаболизма. Это понимание митохондриального метаболизма имеет огромную важность в лечении рака, особенно рака, где существует неудовлетворенная потребность в борьбе с ранее существовавший, внутренней лекарственной резистентностью и приобретенной лекарственной резистентностью после воздействия лекарственного средства.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы, связанные с ингибированием роста или пролиферации опухоли и/или иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение того, характеризуется ли опухоль и/или иммунная клетка уровнем липоилирования белка выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления способы включают контакт опухоли и/или иммунной клетки с ионофором меди, если уровень липоилирования белка выше порогового уровня.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы, относящиеся

к лечению субъекта от рака, который трудно поддается лечению противораковым агентом. В некоторых вариантах осуществления, способы включают определение того, имеет ли рак уровень липоилирования белка выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления, способы включают совместное введение ионофора меди и противоракового агента субъекту, если рак характеризуется уровнем липоилирования белка выше порогового уровня.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы, связанные с идентификацией потенциального противоракового агента. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию контакта образца клеток с тестируемым агентом. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию измерения уровня липоилирования клеточного белка в образце клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень липоилирования клеточного белка снижен по сравнению с уровнем липоилирования клеточного белка образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы, связанные с определением повышенного метаболизма митохондрий в опухолевой и/или иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления, способы включают окрашивание липоевой кислоты в опухоли и/или иммунной клетке.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы, связанные с идентификацией противоракового агента-кандидата. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию инкубации образца клеток со средой с добавлением меди. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию контакта образца клеток с тестируемым агентом. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию измерения жизнеспособности клеток в образце клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы включают стадию идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень жизнеспособности клеток снижен по сравнению с уровнем жизнеспособности клеток образца клеток, инкубированного со средой с добавлением меди и не контактировавшего с тестируемым агентом.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы, связанные с идентификацией противоракового агента-кандидата. Такие способы могут включать стадию инкубации образца клетки с хелатором меди, стадию контакта образца клетки с тестируемым агентом и/или стадию измерения гибели клеток в образце клетки. В таких способах, тестируемый агент может быть идентифицирован как противораковый агент-кандидат, если уровень гибели клеток снижен по сравнению с уровнем гибели клеток в образце клеток, инкубированном с хелатором меди и не контактировавшем с тестируемым агентом.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, содержащего тестируемого агента, и анализ для

измерения липоилирования клеточного белка.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий среду с добавлением меди, тестируемый агент и анализ для измерения жизнеспособности клеток.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий хелатор меди, тестируемый агент и анализ для измерения гибели клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 показаны типовые результаты, демонстрирующие роль меди в уничтожении элескломола.

На фигуре 2 показаны типовые результаты скринингов спасения полногеномной CRISPR из Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019.

На фигуре 3 показан анализ биомаркеров PRISM на чувствительность к элескломолу из Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019.

На фигуре 4 показана ленточная структура FDX1 с остатками связывания элескломола, окрашенными согласно Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019.

На фигуре 5 показано изменение сборки Fe-S с течением времени в отсутствие элескломола (контроль) или в присутствии 5-кратного или 10-кратного элескломола из Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019.

На фигуре 6 показаны типовые результаты, иллюстрирующие, что элескломол-Cu(II) является нео-субстратом FDX1 из Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019.

На фигуре 7 показаны типовые результаты, указывающие на то, что повышенные уровни митохондриального метаболизма прогнозируют чувствительность к элескломолу.

На фигуре 8 показаны типовые результаты, указывающие на то, что FDX1 регулирует путь липоевой кислоты в клетках, липоевая кислота связывает медь, и элескломол снижает содержание клеточной липоевой кислоты.

На фигуре 9 показано стимулирование медь-зависимой гибели клеток в раковых клетках с помощью типовых соединений.

На фигуре 10 показано окрашивание липоевой кислотой для выявления повышенных уровней митохондриального метаболизма в опухолях, чувствительных к элескломолу.

На фигуре 11 показаны типовые результаты, указывающие на то, что митохондриальная токсичность меди приводит к не апоптозной гибели клеток.

На фигуре 12 показаны типовые результаты вторичного скрининга перенацеливания PRISM. Тепловая карта окрашена с использованием максимальной корреляции Пирсона между всеми дозами каждой пары соединений.

На фигуре 13 показана жизнеспособность клеток MON после обработки возрастающими дозами указанных лекарственных средств в присутствии 10 мкМ FeCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, NiCl₂, CuCl₂ или CoCl₂.

На фигуре 14 показана жизнеспособность клеток NCIH2030 после обработки

возрастающими дозами указанных лекарственных средств в присутствии 10 мкМ FeCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, NiCl, CuCl₂ или CoCl₂.

На фигуре 15 показано, что содержание меди в сыворотке определяет токсичность элескломола в клетках BCPAP и клетках PSN1.

На фигуре 16 показано, что содержание меди в сыворотке определяет токсичность элескломола в клетках A549.

На фигуре 17 показана экспериментальная установка скрининга положительной селекции CRISPR-Cas9 в клетках A549 с использованием библиотеки, таргетирующей 3000 генов, связанных с метаболизмом (~10 гРНК на ген).

На фигуре 18 показана делеция FDX1 в клетках A549, придающая относительную резистентность к элескломолу-Cu(II) и дисульфираму-Cu(II), и делеция LIAS или FDX1 в клетках OVISe придают резистентность к элескломолу-Cu(II).

На фигуре 19 показано, что делеция FDX1 коррелирует с делецией компонентов двух различных путей.

На фигуре 20 показан типовой вестерн-блоттинг, демонстрирующий делецию FDX1, устраняющую клеточные липоилированные белки как в клетках OVISe, так и в клетках K562.

На фигуре 21 показаны типовые микроскопические изображения, демонстрирующие, что делеция FDX1 устраняет клеточные липоилированные белки как в клетках OVISe, так и в клетках K562.

На фигуре 22 показана предполагаемая модель функции FDX1 в пути липоевой кислоты.

На фигуре 23 показано распределение жизнеспособности 724 клеточных линий, исследованных с помощью

На фигуре 24 показана экспериментальная валидация уровней экспрессии FDX1.

На фигуре 25 показан вестерн-блоттинг липоилированных белков в резистентных и чувствительных клетках.

На фигуре 26 показаны уровни снижения липоилирования после обработки клеток A549 1 мкМ элескломола (+CuCl₂).

На фигуре 27 показаны типовые микрофотографии контрольной обработки или обработки 100 нМ элескломола в течение 24 часов клеток, инкубированных либо с 1 мкМ CuCl₂, либо с 1 мкМ CuCl₂.

На фигуре 28 показана жизнеспособность пяти клеточных линий рака яичников после обработки либо элескломолем, либо элескломолем-Cu (соотношение 1:1).

На фигуре 29 представлена схема пути апоптоза; экспериментальные ингибированные мишени отмечены красным.

На фигуре 30 показаны типовые результаты жизнеспособности клеток 143B и 143B Rho0, выращенных в среде, содержащей либо глюкозу, либо галактозу, через 72 часа.

На фигуре 31 показаны типовые результаты жизнеспособности клеток 143B и 143B Rho0, обработанных указанными концентрациями элескломола-Cu (соотношение 1:1) через

72 часа.

На фигурах 32A-F показаны типовые результаты жизнеспособности контрольных клеток HCM18 или клеток Вах и с делецией Вах после обработки указанными концентрациями различных соединений (пиритион-Cu представляет собой пиритион-CuCl₂ (1:1); TMT-Cu представляет собой TMT-CuCl₂ (1:1); 8HQ-Cu представляет собой 8-HQ-CuCl₂ (1:1); дисульфирам-Cu представляет собой дисульфирам-CuCl₂ (1:1); NSC319726-Cu представляет собой NSC319726-Cu Cl₂ 1(1:1); AntiA представляет собой антимицин А).

На фигурах 32G-L показаны типовые результаты жизнеспособности клеток NCHN2030, выращенных в присутствии 10 mM глюкозы или 10 mM галактозы в среде через 72 часа (пиритион-Cu представляет собой пиритион-CuCl₂ (1:1); TMT-Cu представляет собой TMT-CuCl₂ (1:1); 8HQ-Cu представляет собой 8-HQ-CuCl₂ (1:1); дисульфирам-Cu представляет собой дисульфирам-CuCl₂ (1:1); NSC319726-Cu представляет собой NSC319726-Cu Cl₂ 1(1:1); AntiA представляет собой антимицин А).

На фигурах 32M-U показаны типовые результаты жизнеспособности клеток 143B и 143B Rho0 после 72 часов обработки указанными соединениями в указанных концентрациях (пиритион-Cu представляет собой пиритион-CuCl₂ (1:1); TMT-Cu представляет собой TMT-CuCl₂ (1:1); 8HQ-Cu представляет собой 8-HQ-CuCl₂ (1:1); дисульфирам-Cu представляет собой дисульфирам-CuCl₂ (1:1); NSC319726-Cu представляет собой NSC319726-Cu Cl₂ 1(1:1); AntiA представляет собой антимицин А).

На фигурах 33A-D показаны типовые результаты скрининга нокаута гена CRISPR-Cas9.

На фигуре 34 показана схема пути липоевой кислоты. Кластерный фермент Fe-S LIAS регулирует липоилирование лизина ферментов, включая DLAT.

На фигуре 35 показано среднее изменение Log₂ в метаболитах между клетками FDX1 KO K562 и контрольными клетками AAVS1 K562, разделенными функциональными обозначениями. Метаболиты, отмеченные оранжевым цветом, относятся к пути липоевой кислоты.

На фигуре 36 показан типовой вестерн-блоттинг клеток MON, обработанных в течение 8 часов указанными концентрациями элескломола и проанализированных на содержание липоилированного белка.

На фигуре 37 показано типовое количественное определение уровней липоилированных DLAT и DLST после обработки клеток 40 нМ элескломола в течение 6 часов.

На фигуре 38 показаны типовые результаты анализа изменений копий гена FDX1.

На фигуре 39 показаны результаты первого скрининга лекарственного средства с 1583 соединениями (левая панель) и результаты второго скрининга лекарственного средства с 851 соединением (средняя панель) и типовые ионофоры меди (правая панель). Первый скрининг лекарственного средства проводят с 1583 соединениями в 4-5 дозах на модели клеток, резистентных к ингибиторам протеасом, по сравнению с контролем. Второй скрининг лекарственного средства проводят с 851 соединением в 5 дозах в модели с

высоким уровнем OXPHOS по сравнению с метаболизмом гликолитических клеток. Ионифоры меди являются единственным классом соединений, которые предпочтительно убивают клетки как в состоянии высокой резистентности к OXPHOS, так и в состоянии резистентности к PI.

На фигуре 40 схематично показаны классические пути гибели клеток (апоптоз, некроптоз и ферроптоз) и пути гибели клеток при купроптозе. Купроптоз представляет собой новую форму регулируемой гибели клеток с отдельными нижестоящими регуляторами, не используемыми совместно с другими программами регулируемой гибели клеток, такими как апоптоз, ферроптоз и некроптоз.

На фигуре 41 показаны показательные результаты скрининга делеций полногеномной CRISPR/Cas9 с двумя ионифорами меди (левая панель) и диаграмма Венна, показывающая, что все делеции генов, спасающие от купроптоза, связаны с липоилированием белка, регулируемого FDX1 (правая панель). Скрининг делеции полногеномной CRISPR/Cas9 с положительной селекцией двух различных ионифоров, связанных с медью (Элескломол-Cu и Cu-DDC), выявил один общий класс генов, делеция которого способствует резистентности к обоим соединениям. Эти гены включают FDX1, ферменты липоилирования белков (LIAS, LIPT1 и DLD) и субъединицы липоилированного белкового комплекса пируватдегидрогеназы (DLAT, PDHA1 и PDHB).

На фигуре 42 показана схема пути липоилирования белка.

На фигуре 43 показана схема пути липоилирования белка, устанавливающая то, что FDX1 является вышестоящим регулятором липоилирования белка (левая панель), и анализ DepMap зависимостей делеции генов в сотнях линий раковых клеток (правая панель). Анализ зависимостей генов в сотнях линий раковых клеток показывает, что зависимость генов FDX1 сильно коррелирует с зависимостями белков, участвующих в липоилировании.

На фигуре 44 показаны типовые графики, демонстрирующие уровни белка FDX1 и липоилированных белков в чувствительных и резистентных к элескломолу клеточных линиях.

На фигуре 45 показан типовой график, основанный на иммуногистохимическом (ИHC) анализе окрашивания липоилированных белков в сотнях опухолей различного происхождения, который устанавливает липоилирование белка в качестве белкового биомаркера для разделения пациентов.

На фигуре 46 показана типовая ИHC микрофотография стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST) (левая панель) и круговая диаграмма GIST с дефицитом SDH (сукцинатдегидрогеназы). Почти все опухоли GIST с дефицитом SDHB демонстрируют высокий уровень липоилирования белка. Результат окрашивания показывает, что определенные опухоли GIST с истощением белка SDHB митохондриального комплекса II (в основном из-за мутаций в генах SDHA и SDHB) демонстрируют особенно высокие уровни окрашивания LA.

На фигуре 47 показан типовой график, который устанавливает модель ксенотрансплантата мыши с положительным биомаркером.

На фигуре 48 показаны типовые новые ионофоры меди на основе каркаса элескломола. Дизайн основан на гибкой взаимосвязи структура-деятельность и структура-свойства-отношение. Синтезируют 6 аналогов элескломола с ранним гибким SAR.

На фигуре 49 показано, что цитотоксичность аналогов элескломол-Cu(II) в клетках зависит от их окислительно-восстановительного потенциала. Окислительно-восстановительный потенциал различных аналогов элескломола при связывании с медью составляет от -50 мВ до -400 мВ, чтобы соединение эффективно убивало клетки ($IC_{50} < 300$ нМ в MD-MBA455).

На фигуре 50 показаны результаты вторичного скрининга перенацеливания PRISM, который включает оценки ингибирования роста для 1448 лекарственных средств в сравнении с 489 клеточными линиями. Ионофоры меди группируют в пространстве с лекарственным средством.

На фигуре 51 показана схема конвейера по разработке новых лекарственных средств.

На фигурах 52A-C показаны типовые графики анализа тканевого микроматрицы (ТМА) резекции карциномы молочной железы человека ($n=67$), карциномы яичника ($n=84$) и немелкоклеточной карциномы легкого человека (NSCLC) ($N=57$, 2 повтора на случай), окрашенных LA и FDX IHC, и экспрессию оценивают полуколичественно двумя патологоанатомами (S.C., S.S.), демонстрируя сильную прямую корреляцию между экспрессией LA и FDX (среднее значение $\pm$ CO; $p < 0,0001$).

На фигурах 52D-F показаны типовые микрофотографии окрашивания IHC. Типовые случаи карциномы молочной железы (D), карциномы яичника (E) и NSCLC (F) с коррелированной низкой (верхний ряд) и высокой (нижний ряд) экспрессией LA и FDX1 с помощью IHC (шкала 20 мкм).

На фигурах 53A-D показаны типовые вестерн-блоты, демонстрирующие делецию FDX1, устраняющую клеточные липоилированные белки (DLAT и DLST), в клетках PSN1 (A-B), VCPAP (C) и ABC1 (D).

На фигурах 53E-H показаны типовые графики, демонстрирующие, что делеция FDX1 в клетках ABC1 (EF) и PSN1 (GH) прекращает дыхание. Фермент липоилирования, ограничивающий скорость, LIAS используют в качестве эталонного контроля.

На фигурах 54A-E показаны типовые графики логарифмической кратности изменения по сравнению с вычисленным значением p для генов FDX1 (A), DLAT (B), DLD (C) и LIAS (D) из двух полногеномных скринингов делеций CRISPR/Cas9 в клеточных линиях A549 для двух концентраций элескломола-Cu (40 нМ и 100 нМ). (E) Оценки корреляции экспрессии мРНК FDX1 с жизнеспособностью 724 линий раковых клеток, как было определено ранее (4) для различных концентраций элескломола.

На фигурах 55A-C показан типовой вестерн-блоттинг и графики клеточных клонов отдельных клеток ABC1 с делециями контрольного гена AAVS1 или FDX1. На панели A показан FDX1, липоилированные DLAT и DLST и винкулин (в качестве контроля загрузки). Относительную чувствительность каждого отдельного клеточного клона к элескломолу (в присутствии 1 мкМ $CuCl_2$) измеряют от нижней части панели A на панели B. На панели C

показана корреляция EC50 элескломола и относительных уровней белка FDX1. Снижение FDX1 выше определенного порога увеличивает резистентность клеток к элескломолу.

На фигурах 56A-F показаны типовые графики, на которых исследуется эффективность элескломола в условиях, которые имитируют фармакокинетические (ФК) свойства, ранее описанные в моделях на мышах. На панели A показано, что положительные по биомаркерам (высокая экспрессия гена FDX1) клетки более чувствительны к элескломолу, чем отрицательные по биомаркерам клетки. Панели B и C показывают жизнеспособность положительных по биомаркерам клеток - ABC1 (панель B) и отрицательных по биомаркерам - клеток A549 (панель C), измеренных в указанные моменты времени после 2-часового импульса 100 нМ элескломола в присутствии 1 мкМ CuCl_2 в среде. На панелях D и E показаны относительные изменения метаболитов, измеренные в ABC1(D) и A549 (E) через 24 часа после 2-часовой обработки импульсом 100 нМ элескломола. На панели F показаны изменения в седогептулоза-7-фосфате в клетках ABC1 после обработки импульсом 100 нМ элескломола. На панели G показаны изменения в седогептулоза-7-фосфате в контрольных клетках AAVS1 и FDX1 KO ABC1, обработанных в течение 24 часов 1 нМ элескломола.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Общее

В некоторых аспектах, способы и композиции, представленные в настоящем документе, частично основаны на открытии того, что опухолевые клетки, экспрессирующие определенные биомаркеры, можно эффективно обрабатывать ионофором меди. Примеры ионофоров меди включают элескломол и дисульфиды, которые ранее были описаны в заявке на патент США 2018/0353445. В настоящем документе представлены способы измерения уровней некоторых биомаркеров, таких как липоилированные белки (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT) и белки биосинтеза липоевой кислоты (*например*, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD) в опухолевых клетках. Также в настоящем документе предложены способы измерения биомаркеров в сочетании с некоторыми митохондриальными белками, которые связывают ионофоры меди (*например*, FDX1, ALDH1A1, ALDH2). В некоторых аспектах, способы и композиции, предложенные в настоящем документе, могут быть с успехом использованы для ингибирования роста или пролиферации опухоли, лечения рефрактерного рака и/или идентификации противоракового агента-кандидата. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы и композиции, предложенные в настоящем документе, особенно полезны для лечения рака, резистентного к таргетной лекарственной терапии.

Определения

Для удобства здесь собраны некоторые термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения.

Артикли «a» и «an» используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (*т. е.* по меньшей мере, одного) грамматического объекта артикля.

Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Используемый в настоящем документе термин «*введение*» означает введение фармацевтического агента или композиции субъекту и включает, помимо прочего, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

Термин «*агент*» относится к любому веществу, соединению (например, молекуле), надмолекулярному комплексу, материалу или их комбинации или смеси.

Термин «*антитело*» может относиться как к интактному антителу, так и к его антигенсвязывающему фрагменту. Интактные антитела представляют собой гликопротеины, включающие, по меньшей мере, две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (обозначаемую в настоящем документе сокращенно как VH) и константную область тяжелой цепи. Каждая легкая цепь включает переменную область легкой цепи (обозначаемую в настоящем документе сокращенно как VL) и константную область легкой цепи. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Термин «антитело» включает, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител.

Каждый из терминов «*биологический образец*», «*образец ткани*» или просто «*образец*» относится к набору клеток, полученных из ткани субъекта. Источником образца ткани может быть твердая ткань, например, из свежего, замороженного и/или законсервированного органа, образец ткани, биоптат или аспират; кровь или любые компоненты крови, сыворотка, кровь; телесные жидкости, такие как спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, перитонеальная жидкость или интерстициальная жидкость, моча, слюна, стул, слезы; или клетки из любого периода беременности или развития субъекта.

Термин «*связывание*» или «*взаимодействующий*» относится к ассоциации, которая может быть стабильной ассоциацией между двумя молекулами, например, вследствие электростатических, гидрофобных, ионных и/или водородных взаимодействий в физиологических условиях.

Термин «*измерение*» относится к определению наличия, отсутствия, количества или эффективного количества вещества в образце, включая уровни концентрации таких веществ.

Термин «*трудно поддающийся лечению*» относится к раку, который не отвечает на лечение. Отсутствие ответа можно оценить, например, по отсутствию ингибирования роста опухоли или повышенному росту опухоли; отсутствию уменьшения количества опухолевых клеток или увеличению количества опухолевых клеток; усилению инфильтрации опухолевых клеток в соседние периферические органы и/или ткани; повышенному метастазированию; снижению продолжительности жизни после лечения; и/или смертности. Рак может быть резистентным в начале лечения или стать резистентным во время лечения.

Используемый в настоящем документе термин «*субъект*» означает человека или животное, отличное от человека, выбранное для лечения или терапии.

Термин «*лечение*» включает профилактическое и/или терапевтическое лечение. Термин «профилактическое или терапевтическое» лечение является известным в данной области техники и включает введение пациенту одной или нескольких рассматриваемых композиций. Если его вводят до клинических проявлений нежелательного состояния (например, болезни или другого нежелательного состояния животного-хозяина), то лечение является профилактическим (т. е. оно защищает хозяина от развития нежелательного состояния), тогда как если его вводят после проявления нежелательного состояния, лечение является терапевтическим (т.е. оно предназначено для уменьшения, облегчения или стабилизации существующего нежелательного состояния или его побочных эффектов).

Используемый в настоящем документе терапевтический агент, который «*предотвращает*» нарушение или состояние, относится к соединению, которое, в статистической выборке, уменьшает возникновение нарушения или состояния в обработанном образце по сравнению с необработанным контрольным образцом, или задерживает начало или уменьшает тяжесть одного или нескольких симптомов нарушения или состояния по сравнению с необработанным контрольным образцом.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические соединения можно применять отдельно или совместно с другим типом терапевтического агента (*например*, иммуноонкологическим агентом или химиотерапевтическим агентом, описанным в настоящем документе). Используемая в настоящем документе фраза «*совместное введение*» относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических соединений, так что второе соединение вводят, когда ранее введенное терапевтическое соединение все еще эффективно в организме (*например*, два соединения одновременно эффективны у пациента, что может включать синергетическое действие двух соединений). Например, различные терапевтические соединения можно вводить либо в одном и том же составе, либо в разных составах, либо одновременно, либо последовательно. В некоторых вариантах осуществления различные терапевтические соединения можно вводить в течение одного часа, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 72 часов или недели друг от друга. Таким образом, индивидуум, получающий такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических соединений.

В некоторых вариантах осуществления, совместное введение терапевтических соединений с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами (*например*, одним или несколькими дополнительными химиотерапевтическими агентами)) обеспечивает улучшенную эффективность по сравнению с каждым отдельным введением соединения (*например*, ионофора меди) или одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых таких вариантах осуществления, совместное введение обеспечивает аддитивный эффект, при этом аддитивный эффект относится к сумме каждого из эффектов индивидуального введения терапевтического соединения и одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

Фармацевтические композиции и введение

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены фармацевтические композиции и способы применения фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции содержат ионофор меди (*например*, элескломол, дисульфид). В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции содержат противораковый агент (*например*, химиотерапевтический агент, ингибитор иммунной контрольной точки, ингибитор EGFR или ингибитор протеасомы).

Это изобретение также предлагает композиции и способы, которые можно использовать для лечения субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется рак, необязательно резистентный к лекарственным средствам рак, например, резистентный к лекарственным средствам рак с биомаркерами липоилирования. При введении субъекту, такому как человек, композицию или соединение, предпочтительно, вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, терапевтическое соединение и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или органические сложные эфиры для инъекций. В некоторых вариантах осуществления, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, в частности, для инвазивных путей введения (т.е. путей, таких как инъекция или имплантация, которые обходят транспорт или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор является апирогенным, или практически апирогенным. Эксципиенты могут быть выбраны, например, для обеспечения замедленного высвобождения агента или для избирательного таргетирования одной или нескольких клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в стандартной дозированной форме, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемые и желатиновые капсулы), гранулы, лиофилизаты для восстановления, порошок, раствор, сироп, суппозиторий, инъекция или подобные.

Композиция также может присутствовать в системе трансдермальной доставки, например в кожном пластыре. Композиция также может находиться в растворе, подходящем для местного применения, таком как глазные капли.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель. Фраза «фармацевтически приемлемый носитель», используемая в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал. Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, стабилизируя, увеличивая растворимость или увеличивая абсорбцию соединения. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или эксципиенты. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого агента, зависит, например, от пути введения композиции. Препарат или фармацевтическая композиция может представлять собой самоэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства или самомикроэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства. Фармацевтическая композиция (препарат) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, в которую может быть включено, например, терапевтическое соединение. Липосомы, например, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просто изготовить и ввести.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, можно вводить субъекту любым из нескольких способов введения, включая, например, пероральный (например, в виде капель, таких как водные или не водные растворы или суспензии, таблетки, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык); всасывание через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); анально, ректальный или вагинальный (например, в виде пессария, крема или пены); парентеральный (в том числе внутримышечный, внутривенный, подкожный или интратекальный в виде, например, стерильного раствора или суспензии); назальный; внутрибрюшинный; подкожный; трансдермальный (например, в виде пластыря,

накладываемого на кожу); и местный (например, в виде крема, мази или спрея, наносимого на кожу, или в виде глазных капель). Соединение также может быть составлено для ингаляции. В некоторых вариантах осуществления, соединение можно просто растворить или суспендировать в стерильной воде. Подробности соответствующих путей введения и композиций, подходящих для них, можно найти, например, в патентах США №№ 6,110,973, 5,763,493, 5,731,000, 5,541,231, 5,427,798, 5,358,970 и 4,172,896 а также в цитируемых в них патентах.

Составы могут быть представлены в стандартной дозированной форме, и могут быть приготовлены любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения стандартной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения стандартной дозированной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтическое действие. Как правило, из ста процентов это количество составляет от около 1 до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно, от около 5 до около 70 процентов, наиболее предпочтительно, от около 10 до около 30 процентов.

Способы приготовления этих составов или композиций включают стадию связывания активного соединения с носителем и, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Как правило, составы готовят путем однородного и тщательного смешивания соединения с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или обоими, и затем, при необходимости, формованием продукта.

Составы, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), облаток, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), лиофилизатов, порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или не водной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь) и/или в виде ополаскивателей для рта и подобных, каждый из которых содержит заданное количество соединения в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения можно также вводить в виде болюса, электуария или пасты.

Для приготовления твердых дозированных форм для приема внутрь (капсул (в том числе вскрываемых капсул и желатиновых капсул), таблеток, пилюль, драже, порошков, гранул и подобных), активный ингредиент смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любым из следующих: (1) наполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующими агентами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты,

желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнителями, такими как глицерин; (4) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедлителями растворения, такими как парафин; (6) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающими агентами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразователями, такими как модифицированные и не модифицированные циклодекстрины; и (11) красителями. В случае капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблеток и пилюль, фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и подобные.

Таблетка может быть изготовлена прессованием или формованием, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связующего агента (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего агента, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, крахмалгликолята натрия или поперечно-сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, смоченной инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые дозированные формы фармацевтических композиций, такие как драже, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, необязательно могут иметь насечки, или могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области получения фармацевтических составов. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение содержащегося в них активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Их можно стерилизовать, например, путем фильтрации через удерживающий бактерии фильтр, или путем включения стерилизующих агентов в виде стерильных твердых композиций, которые можно растворять в стерильной воде или какой-либо другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед использованием. Эти композиции также могут необязательно содержать агенты, придающие непрозрачность, и могут иметь такую композицию, что они высвобождают активный(е) ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать,

включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может быть в микроинкапсулированной форме, при необходимости, с одним или несколькими из вышеописанных эксципиентов.

Жидкие дозированные формы, подходящие для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, лиофилизаты для восстановления, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту, жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли, сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, и их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции для ухода за полостью рта могут также включать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

Суспензии, кроме активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метацид гидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, и их смеси.

Составы фармацевтических композиций для ректального, вагинального или уретрального введения могут быть представлены в виде суппозиториев, которые могут быть приготовлены путем смешивания одного или нескольких активных соединений с одним или несколькими подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, включающими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для суппозиториев или салицилат, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, следовательно, будет таять в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождать активное соединение.

Составы фармацевтических композиций для введения в рот могут быть представлены в виде жидкости для полоскания рта, или перорального спрея, или пероральной мази.

Альтернативно или дополнительно, композиции могут быть составлены для доставки через катетер, стент, проволоку или другое внутрисветное устройство. Доставка с помощью таких устройств может быть особенно полезной для доставки в мочевой пузырь, уретру, мочеточник, прямую кишку или кишечник.

Составы, подходящие для вагинального введения, также включают pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или спреи, содержащие такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

Дозированные формы для местного или чрескожного введения включают порошки,

спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингалянты. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, помимо активного соединения, эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать, помимо активного соединения, эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Фразы «парентеральное введение» и «вводимый парентерально», используемые в настоящем документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсульные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, подкожные, внутрисуставные, подкапсульные, субарахноидальные, интраспинальные и интратеральные инъекции и инфузии. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, содержат одно или несколько активных соединений в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или не водными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные растворы или дисперсии для инъекций непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов для покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Профилактика действия микроорганизмов может быть обеспечена включением в состав различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и подобных. Также может быть желательным включение в

композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и подобные. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть вызвано включением агентов, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях, для продления действия препарата желательно замедлить всасывание препарата при подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, плохо растворимого в воде. Тогда скорость всасывания лекарственного средства зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. Альтернативно, замедленное всасывание парентерально вводимой дозированной формы достигается путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Депо-формы для инъекций изготавливают путем формирования микроинкапсулированных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, и природы конкретного используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные составы депо также получают путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

В некоторых вариантах осуществления, активные соединения можно давать сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно, от 0,5 до 90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения также могут быть предоставлены перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и испытаны *in vivo* различные полимерные устройства с медленным высвобождением для контролируемой доставки лекарственных средств, включая белковые биофармацевтические агенты. Разнообразие биосовместимых полимеров (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, можно использовать для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном участке-мишени.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного субъекта, композиции и способа введения, не оказывая при этом токсического воздействия на субъекта.

При желании, эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в виде стандартных дозированных форм. В некоторых вариантах осуществления, активное соединение можно

вводить два или три раза в день. В некоторых вариантах осуществления, активное соединение будет вводиться один раз в день.

В некоторых вариантах осуществления, соединения можно применять отдельно или совместно вводить с другим типом терапевтического агента (например, иммуноонкологическим агентом или химиотерапевтическим агентом, описанным в настоящем документе). Используемая в настоящем документе фраза «совместное введение» относится к любой форме введения двух или нескольких различных терапевтических соединений, так что второе соединение вводят в то время, когда ранее введенное терапевтическое соединение все еще эффективно в организме (например, два соединения одновременно эффективны у пациента, что может включать синергетическое действие двух соединений). Например, различные терапевтические соединения можно вводить либо в одном и том же составе, либо в отдельных составах, либо одновременно, либо последовательно. В некоторых вариантах осуществления, различные терапевтические соединения можно вводить в течение одного часа, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 72 часов или недели друг от друга. Таким образом, индивидуум, получающий такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических соединений.

В некоторых вариантах осуществления, совместное введение терапевтических соединений с одним или несколькими дополнительным(ми) терапевтическим(ми) агентом(ами) (например, одним или несколькими дополнительным(ми) химиотерапевтическим(ми) агентом(ами)) обеспечивает улучшенную эффективность по сравнению с каждым отдельным введением соединения (например, ионофора меди) или одного или нескольких дополнительного(ых) терапевтического(их) агента(ов). В некоторых таких вариантах осуществления, совместное введение обеспечивает аддитивный эффект, при этом аддитивный эффект относится к сумме каждого из эффектов индивидуального введения терапевтического соединения и одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

В некоторых вариантах осуществления, в способах, представленных в настоящем документе, можно использовать фармацевтически приемлемые соли соединений. Подходящие соли включают, но не ограничены ими, HCl, трифторуксусную кислоту (ТФК), малеат, алкильные, диалкильные, триалкильные или тетраалкиламмониевые соли. В некоторых вариантах осуществления, предполагаемые соли включают, но не ограничены ими, L-аргинин, бенентамин, бензатин, бетаин, гидроксид кальция, холин, деанол, диэтаноламин, диэтиламин, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламин, этилендиамин, N-метилглюкамин, гидрабамин, 1H-имидазол, литий, L-лизин, магний, 4-(2-гидроксиэтил)морфолин, пиперазин, калий, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидин, натрий, триэтаноламин, трометамин и соли цинка. В некоторых вариантах осуществления, предполагаемые соли включают, но не ограничены ими, соли Na, Ca, K, Mg, Zn, меди, кобальта, кадмия, марганца или других металлов.

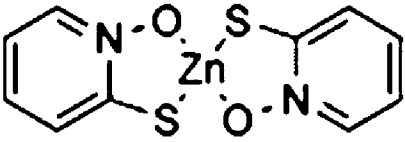
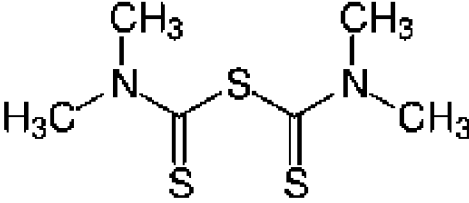
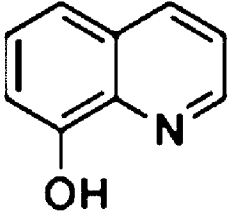
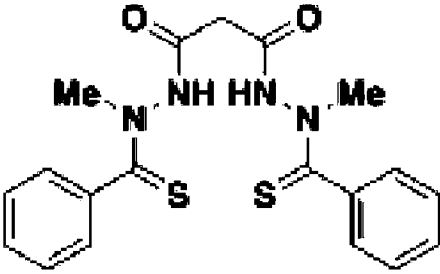
В композициях также могут присутствовать смачивающие агенты, эмульгаторы и

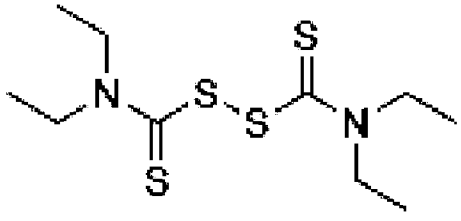
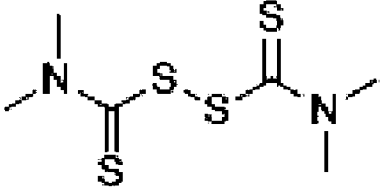
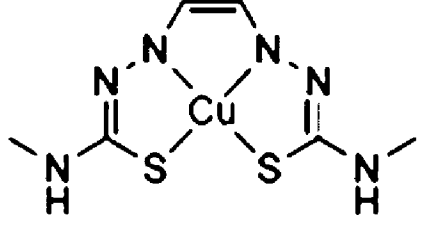
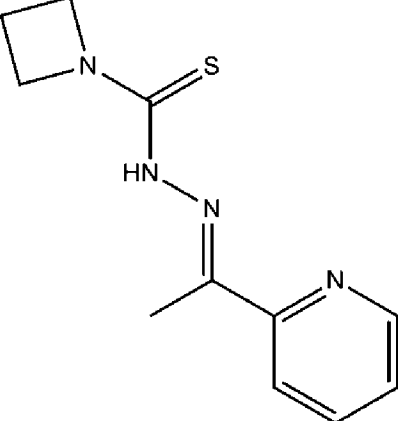
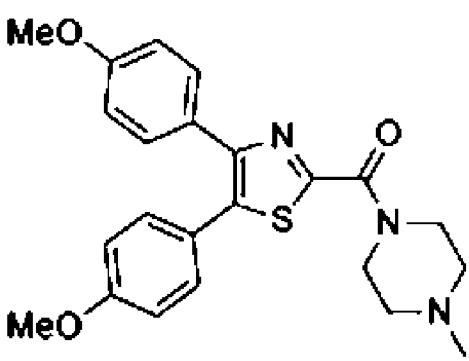
смазывающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивы, покровные агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

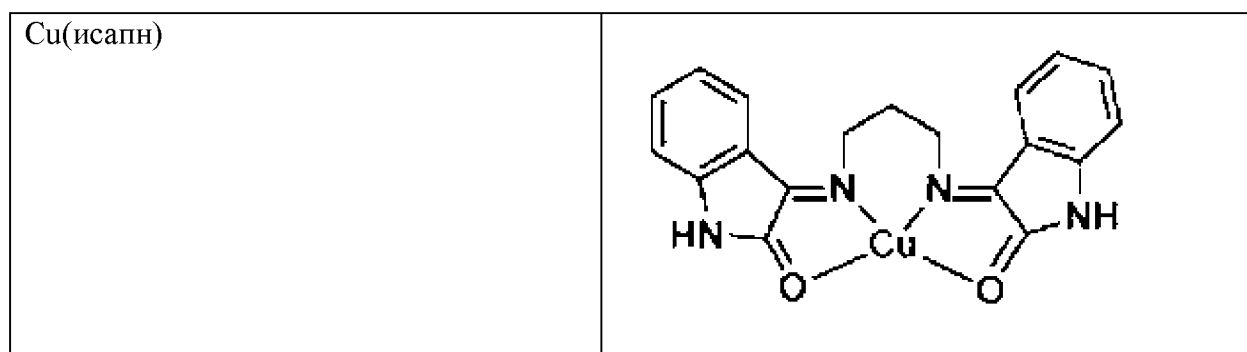
Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и подобные; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и подобные; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и подобные.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение, используемое в способах по настоящему изобретению, представляет собой ионофор меди. Примеры ионофоров меди представлены в таблице 1.

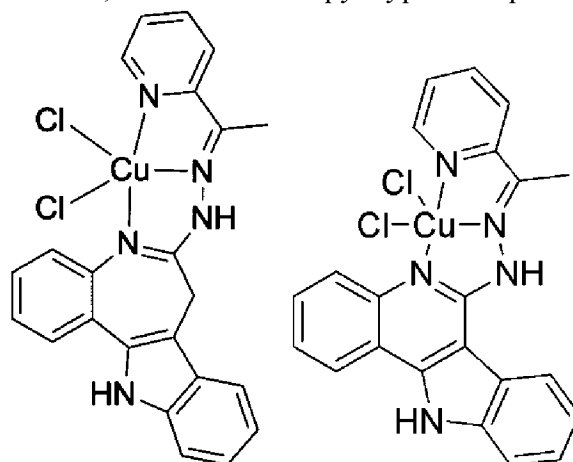
Таблица 1. Примеры ионофоров меди

Название соединения	Структура
Пиритион Цинк	
Тетраметилтиурам-моносulfид	
Оксихинолин (8HQ)	
Элескломол	

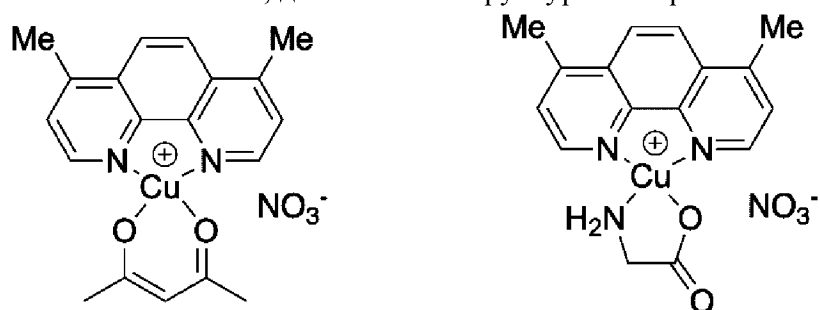
Дисульфiram	 <chem>CCN(CC)C(=S)SSC(=S)N(CC)CC</chem>
Тирам	 <chem>CN(C)C(=S)SSC(=S)N(C)C</chem>
Cu(GTSM)	 <chem>CN1C=NC(S1)SC2=NC=NC(S2)Cu3C=NC(S3)SC4=NC=NC(S4)N</chem>
NSC-319726	 <chem>CC1=CC=CC=C1C(=N)NNC(=S)N2CCC2</chem>
FR-122047	 <chem>COc1ccc(cc1)c2c(s3c(n2)C(=O)N4CCN(C)CC4)c5ccc(OC)cc53</chem>



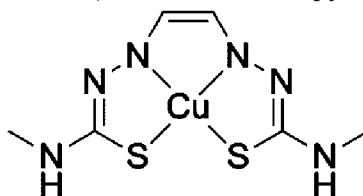
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс на основе Paullone, две типовые структуры которого показаны ниже.



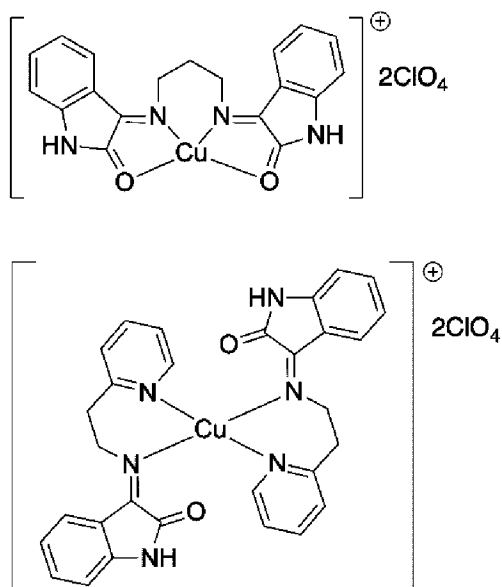
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс на основе казиопеина, две типовые структуры которого показаны ниже.



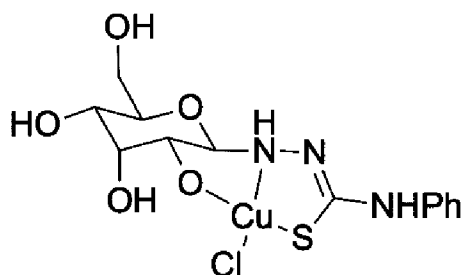
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс бис(тиосемикарбазона) Cu, типовая структура которого показана ниже.



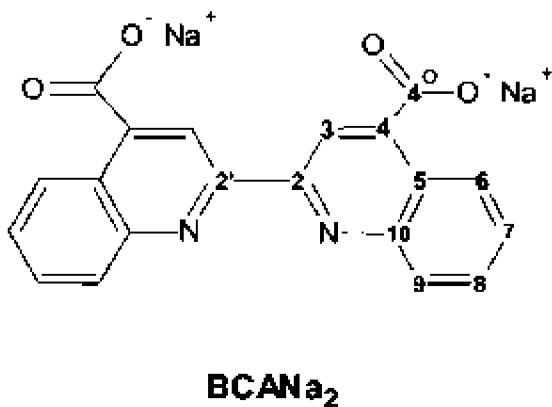
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс на основе Изатина-Шиффа, две типовые структуры которого показаны ниже.



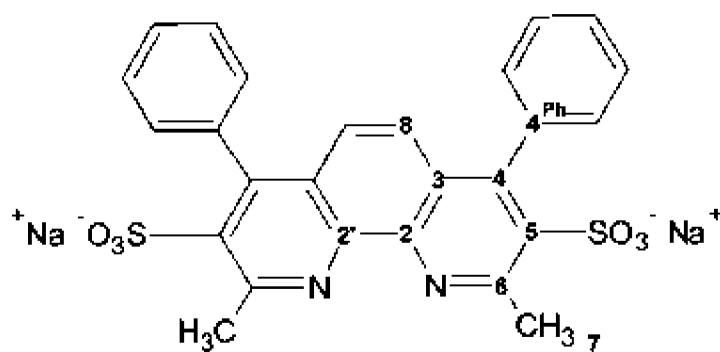
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс (D-глюкопираноза)-4-фенилтиосемикарбазид Cu, типовая структура которого показана ниже.



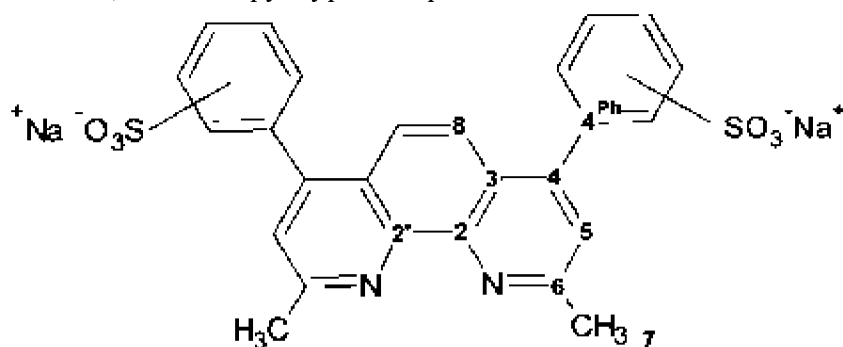
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой BCANa_2 , типовая структура которого показана ниже.



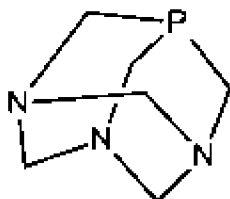
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой BCSNa_2 , типовая структура которого показана ниже.

**BCSNa₂**

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение представляет собой BCSNa₂, общая структура которого показана ниже.

**I BCSNa₂**

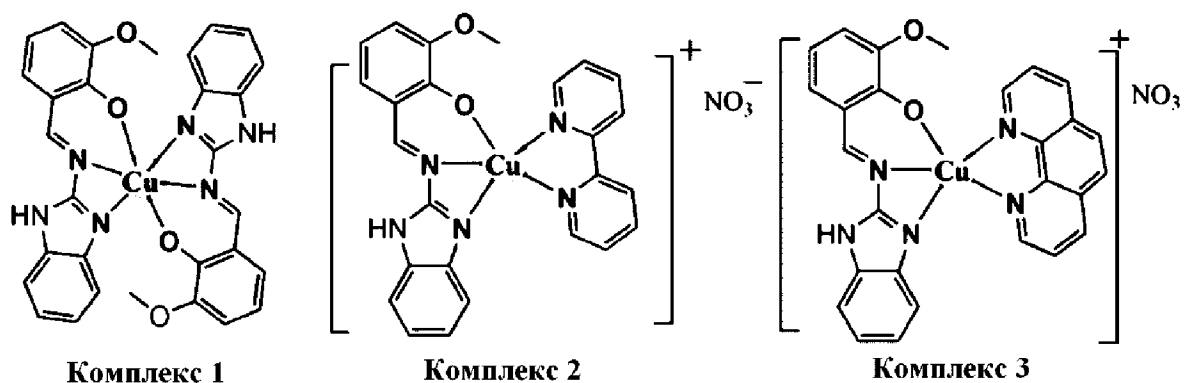
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой РТА, структура которого показана ниже.

**РТА**

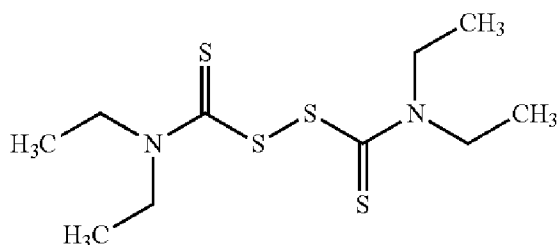
В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение представляет собой DAPТА, структура которого показана ниже.

The figure displays the chemical structures of six ligands (HL¹ to HL⁶) and their corresponding copper(II) complexes. Each ligand is a derivative of a bicyclic system (bicyclo[2.2.2]octane) with a pendant chain containing a pyridine ring and a hydrazine group. The ligands are: HL¹ (NH₂), HL² (NMe₂), HL³ (pyrrolidine), HL⁴ (morpholine), HL⁵ (phenyl), and HL⁶ (NH₂ and SMe). The complexes are shown as copper(II) ions coordinated by the ligand, a chloride ion, and a sulfur atom from the ligand chain. The complexes are labeled HL¹ to HL⁶ on the right side of the figure.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой комплекс оснований Шиффа, типовые структуры которого показаны ниже.

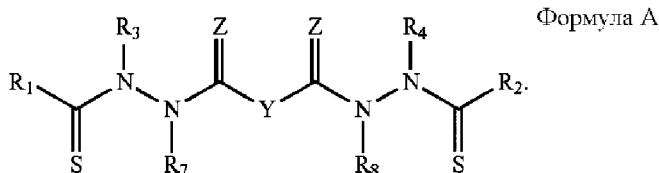


В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой дитиокарбамат. В некоторых вариантах осуществления дитиокарбамат представляет собой тетраэтилтиурамдисульфид (дисульфирам; регистрационный номер CAS 97-77-8), структура которого показана ниже.



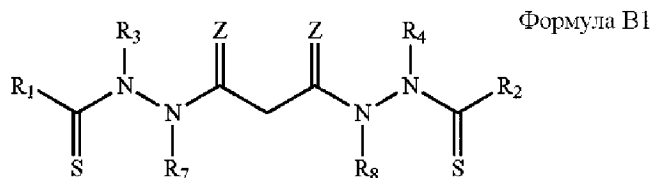
В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой аналог дисульфирама, обозначаемый как соединение 339 (Sharma, V., et al. Mol Carcinog. 2015 Nov 24. doi: 10.1002/mc.22433. [Epub перед публикацией]). В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой метаболит дисульфирама. В некоторых вариантах осуществления, дитиокарбамат представляет собой пирролидиндитиокарбамат (PDTC).

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой бис(тиогидразидамид). Примеры бис(тиогидразидамидов) описаны в патентах США №№ 6,762,204, 6,800,660, 6,924,312, 7,001,923, 7,037,940, публикациях патентов США №№ 20030045518, 20030119914, 20030195258 и 2008011940. Например, в некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразидамид амид) представлен любой из структурных формул (I)-(VI), описанных в патенте США № 6,800,660, с различными переменными и химическими терминами, определенными, как описано в нем. В некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразидамид амид) представлен любой из структурных формул I, II, IIIa, IIIb, IVa, IVb или V, описанных в патенте США: публикация заявки № 20080119440 (US20080119440) с различными переменными и химическими терминами, определенными как описано в нем. Для удобства ниже приведены определения некоторых таких терминов. В некоторых вариантах осуществления, например, соединение имеет следующую структурную формулу (формула 1, как описано в US 20080119440):

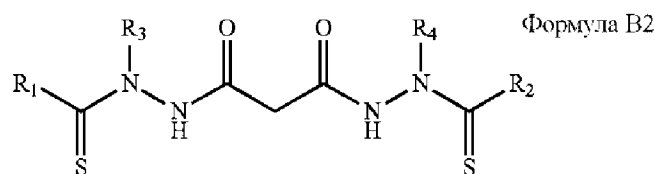


где Y представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную углеводородную группу с прямой цепью, или Y, вместе с обеими группами $>C=Z$, с которыми он связан, представляет собой необязательно замещенную ароматическую группу; R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом; R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и Z представляет собой O или S. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления, R_1 , R_2 или оба представляют собой необязательно замещенные фенильные группы. В некоторых вариантах осуществления, R_1 и R_2 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, R_3 и R_4 представляют собой низшие алкильные группы, например метильные группы. В некоторых вариантах осуществления, R_3 и R_4 являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, Y представляет собой CH_2 . В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O; R_1 , R_2 или оба представляют собой необязательно замещенные фенильные группы, которые могут быть одинаковыми; R_3 и R_4 представляют собой низшие алкильные группы (C1-C8 алкильные группы с прямой или разветвленной цепью или C3-C8 циклические алкильные группы), например, метильные группы, которые необязательно являются одинаковыми; и Y представляет собой CH_2 . В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O; R_1 , R_2 или оба представляют собой необязательно замещенные циклопропильные группы, которые могут быть одинаковыми; R_3 и R_4 представляют собой низшие алкильные группы (C1-C8 алкильные группы с прямой или разветвленной цепью или C3-C8 циклические алкильные группы), например, метильные группы, которые необязательно являются одинаковыми; и Y представляет собой CH_2 . В некоторых вариантах осуществления, R_3 , R_4 или оба представляют собой циклопропил. В некоторых вариантах осуществления R_3 , R_4 или оба представляют собой метилциклопропил. Используемые в настоящем документе одинарные связи представлены символом тире (-), и двойные связи представлены знаком равенства (=).

В некоторых вариантах осуществления, бис(тиогидразамидамид) имеет следующую формулу (формула Mb, как описано в US20080119440):



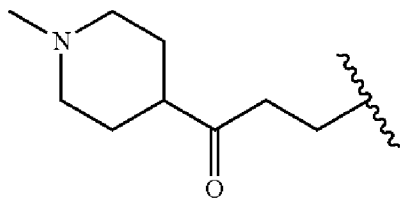
где Z, R₁, R₂, R₃, R₄, R₇ и R₈ имеют значения, указанные выше для формулы А. В некоторых вариантах осуществления, бис(тиогидразамид амид) имеет следующую формулу (формула V, как описано в US20080119440):



где R₁, R₂, R₃ и R₄ имеют значения, указанные выше для формулы А.

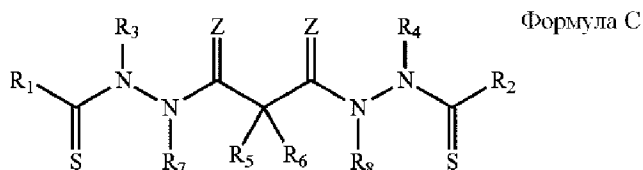
В некоторых вариантах соединений формулы В1 или В2, R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой O--CH₃-фенил; R₁ и R₂ оба представляют собой O--CH₃C(O)O-фенил, и R₃ и R₄ представляют собой фенил; R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой этил; R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой н-пропил; R₁ и R₂ оба представляют собой п-цианофенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой п-нитрофенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2,5-диметоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой н-бутил; R₁ и R₂ оба представляют собой п-хлорфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 3-нитрофенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 3-цианофенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 3-фторфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2-фуриил, и R₃ и R₄ оба представляют собой фенил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2-метоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 3-метоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2,3-диметоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2-метокси-5-хлорфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2,5-дифторфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2,5-дихлорфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2,5-диметилфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2-метокси-5-хлорфенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой 3,6-дитнетоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; R₁ и R₂ оба представляют собой фенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой 2-этилфенил; R₁ и R₂ оба представляют собой 2-метил-5-пиридил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил; или R₁ представляет собой фенил; R₂ представляет собой 2,5-диметоксифенил, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил;

R_1 и R_2 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой p -CF₃-фенил; R_1 и R_2 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой O --CH₃-фенил; R_1 и R_2 оба представляют собой $--(CH_2)_3COOH$; и R_3 и R_4 оба представляют собой фенил; R_1 и R_2 оба представлены следующей структурной формулой:



и R_3 и R_4 оба представляют собой фенил; R_1 и R_2 оба представляют собой n -бутил, и R_3 и R_4 оба представляют собой фенил; R_1 и R_2 оба представляют собой n -пентил, и R_3 и R_4 оба представляют собой фенил; R_1 и R_2 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой 2-пиридил; R_1 и R_2 оба представляют собой циклогексил, и R_3 и R_4 оба представляют собой фенил; R_1 и R_4 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой 2-этилфенил, R_1 и R_2 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой 2,6-дихлорфенил; все R_1 - R_4 представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой метил, и R_3 и R_4 оба представляют собой трет-бутил; R_1 и R_2 оба представляют собой этил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой трет-бутил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой циклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой циклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой этил; R_1 и R_2 оба представляют собой 1-метилциклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой 2-метилциклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой 1-фенилциклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой 2-фенилциклопропил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой циклобутил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 и R_2 оба представляют собой цикlopентил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил; R_1 представляет собой циклопропил, R_2 представляет собой фенил, и R_3 и R_4 оба представляют собой метил. В некоторых вариантах осуществления, например, R_1 и R_2 представляют собой замещенную или незамещенную фенильную группу, и R_3 и R_4 представляют собой низшую алкильную группу (например, метил), где, в некоторых вариантах осуществления, (i) R_1 и R_2 являются одинаковыми; (ii) R_3 и R_4 являются одинаковыми; или (iii) R_1 и R_2 являются одинаковыми и R_3 и R_4 являются одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразамид амид) имеет следующую формулу (формула IIIa, как описано в US20080119440):



где Z , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_7 и R_8 имеют значения, указанные выше для формулы A, и где R_5 и R_6 независимо представляют собой -H или низший алкил, например, метил, этил, пропил. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления, R_1 , R_2 , R_3 и R_4 имеют значения, определенные для формулы B1 или B2, и R_5 и R_6 независимо представляют собой -H или низший алкил, например, метил, этил, пропил.

Как используется в настоящем документе, если не указано иное, в соответствии с US20080119440, «алкильная группа» представляет собой насыщенную линейную или циклическую углеводородную группу с прямой или разветвленной цепью. Обычно алкильная группа с прямой или разветвленной цепью содержит от 1 до примерно 20 атомов углерода, предпочтительно, от 1 до примерно 10, и циклическая алкильная группа содержит от 3 до примерно 10 атомов углерода, предпочтительно от 3 до примерно 8. Алкильная группа представляет собой предпочтительно алкильная группа с прямой или разветвленной цепью, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, гексил, пентил или октил, или циклоалкильная группа, содержащая от 3 до примерно 8 атомов углерода. C1-C8 алкильная группа с прямой или разветвленной цепью или C3-C8 циклическая алкильная группа также упоминается как «низшая алкильная» группа, как указано выше.

«Гидрокарбильная группа с прямой цепью» представляет собой алкиленовую группу, т.е. $-(CH_2)_y-$, с одной или несколькими (предпочтительно одной) внутренними метиленовыми группами $-(CH_2)-$, необязательно замещенными связывающей группой. y представляет собой положительное целое число (например, от 1 до 10), предпочтительно, от 1 до 6, и более предпочтительно, от 1 до 2. «Связывающая группа» в данном контексте относится к функциональной группе, которая заменяет метилен в гидрокарбиле с прямой цепью. Примеры подходящих связующих групп включают кетон $-C(O)-$, алкен, алкин, фенилен, простой эфир $-O-$, тиоэфир $-S-$ или амин $-N(R_3)-$, где R такой, как определен ниже.

«Алифатическая группа» представляет собой неароматический углеводород с прямой, разветвленной или циклической цепью, который является полностью насыщенным или который содержит одну или несколько единиц ненасыщенности. Как правило, алифатическая группа с прямой или разветвленной цепью содержит от 1 до примерно 20 атомов углерода, предпочтительно, от 1 до примерно 10, и циклическая алифатическая группа содержит от 3 до примерно 10 атомов углерода, предпочтительно, от 3 до примерно 8. Алифатическая группа предпочтительно представляет собой алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, гексил, пентил или октил, или циклоалкильную группу, содержащую от 3 до примерно 8 атомов углерода.

Термин «ароматическая группа» может использоваться взаимозаменяемо с «арилом», «арильным кольцом», «ароматическим кольцом», «арильной группой» и «ароматической группой». Ароматические группы включают карбоциклические

ароматические группы, такие как фенил, нафтил и антразол, и гетероарильные группы, такие как имидазолил, тиенил, фуранил, пиридил, пиримидил, пиразолил, пирроил, пиразинил, тиазол, оксазолил и тетразол. Термин «гетероарильная группа» может использоваться взаимозаменяемо с терминами «гетероарил», «гетероарильное кольцо», «гетероароматическое кольцо» и «гетероароматическая группа». Гетероармические группы представляют собой ароматические группы, которые содержат один или несколько гетероатомов, таких как сера, кислород и азот, в кольцевой структуре. Предпочтительно, гетероарильные группы содержат от одного до четырех гетероатомов. Ароматические группы также включают конденсированные полициклические ароматические кольцевые системы, в которых карбоциклическое ароматическое кольцо или гетероарильное кольцо конденсировано с одним или несколькими другими гетероарильными кольцами. Примеры включают бензотиенил, индолил, хинолинил, бензотиазол, бензооксазол, бензимидазол, хинолинил, изохинолинил и изоиндолил. Неароматические гетероциклические кольца представляют собой неароматические кольца, которые содержат в кольце один или несколько гетероатомов, таких как азот, кислород или сера. Кольцо может быть пяти-, шести-, семи- или восьмичленным. Предпочтительно, гетероциклические группы содержат от одного до примерно четырех гетероатомов. Примеры включают тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, морфолино, тиоморфолино, пирролидинил, пиперазинил, пиперидинил и тиазолидинил.

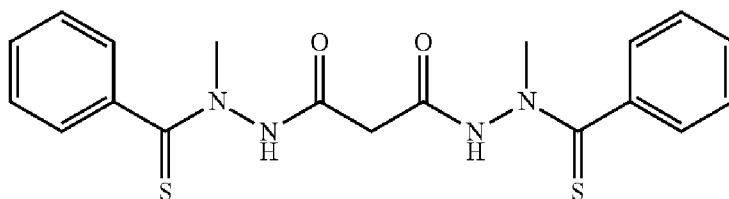
Примеры подходящих заместителей для арильной группы или алифатической группы описаны в публикации заявки на патент США № 20080119440. Например, в некоторых вариантах осуществления заместитель представляет собой группу, выбранную из R^a , $--OH$, $--Br$, $--Cl$, $--F$, $--O--COR^a$, $--CN$, $--NCS$, $--NO_2$, $--COOH$, $--NH_2$, $--N(R^aR^b)$, $--COOR^a$, $--CHO$, $--CONH_2$, $--CONHR^a$, $--CON(R^aR^b)$, $--NHCOR^a$, $--NRCCOR^a$, $--NHCONH_2$, $--NHCONR^aH$, $--NHCON(R^aR^b)$, $--NR^cCONH_2$, $--NRCCON^aH$, $--NR^cCON(R^aR^b)$, $--C(=NH)--NH_2$, $--C(=NH)--NHW$, $--C(=NH)--N(R^aR^b)$, $--C(NR^c)--NH_2$, $--C(=NR^c)--NHR^a$, $--C(=NR^c)--N(R^aR^b)$, $--NH--C(=NH)--NH_2$, $--NH--C(=NH)--NHR^a$, $--NH--C(=NH)--N(R^aR^b)$, $--NH--C(=NR^c)--NH_2$, $--NH--C(=NR^c)--NH^a$, $--NH--C(=NR^c)--N(R^aR^b)$, $--NR^d--C(=NH)--NH_2$, $--NR^d--C(=NH)--NHR^a$, $--NR^d--C(=NH)--N(R^aR^b)$, $--NR^d--C(=NR^c)--NH_2$, $--NR^d--C(=NR^c)--NHR^a$, $--NR^d--C(=NR^c)--N(R^aR^b)$, $--NHNH_2$, $--NHNHR^a$, $--NHN(R^aR^b)$, $--SO_2NH_2$, $--SO_2NHR^a$, $--SO_2NR^aR^b$, $--CH=CHR^a$, $--CH=CR^aR^b$, $--CR^cCR^aR^b$, $--CR^c=CHR^a$, $--CR^c=CR^aR^b$, $--CCR^a$, $--SH$, $--SR^a$, $--S(O)R^a$, $--S(O)_2R^a$, где R^a - R^d каждый независимо представляет собой алкильную группу, ароматическую группу, неароматическую гетероциклическую группу; или $--N(R^aR^b)$, вместе взятые, образуют необязательно замещенную неароматическую гетероциклическую группу, где алкильная, ароматическая и неароматическая гетероциклическая группа, представленная R^a - R^d , и неароматическая гетероциклическая группа, представленная $--N(R^aR^b)$, каждая необязательно и независимо замещена одной или несколькими группами, представленными $R^\#$, где R представляет собой R^+ , $--O$ (галоалкил), $--SR^+$, $--NO_2$, $--CN$, $--NCS$, $--N(R^+)_2$, $--NHCO_2R^+$, $--NHC(O)R^+$, $--NHNHC(O)R^+$, $--NHC(O)N(R^+)_2$, $--NHNHC(O)N(R^+)_2$, $--NHNHCO_2R^+$, $--C(O)C(O)R^+$, $--C(O)CH_2C(O)R^+$, $--$

CO_2R^+ , $-\text{C}(\text{O})\text{R}^+$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^+)_2$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^+$, $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^+)_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^+$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^+)_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^+$, $-\text{NHSO}_2\text{N}(\text{R}^+)_2$, $-\text{NHSO}_2\text{R}^+$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^+)_2$ или $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^+)_2$; где R^+ представляет собой -H, C1-C4 алкильную группу, моноциклическую гетероарильную группу, неароматическую гетероциклическую группу или фенильную группу, необязательно замещенную алкилом, галогеналкилом, алкокси, галогеналкокси, галогеном, -CN, -NO₂, амин, алкиламин или диалкиламин; или $-\text{N}(\text{R}^+)_2$ представляет собой неароматическую гетероциклическую группу, при условии, что неароматические гетероциклические группы, представленные R^+ и $-\text{N}(\text{R}^+)_2$, которые содержат вторичный кольцевой амин, необязательно ацилированы или алкилированы.

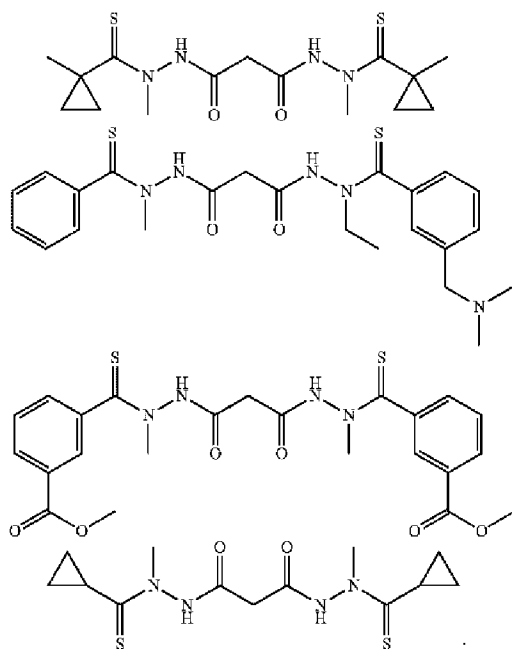
В некоторых вариантах осуществления, заместители для фенильной группы, такие как фенильные группы, которые могут присутствовать в положениях, представленных R_1 - R_4 , включают C1-C4 алкил, C1-C4 алкокси, C1-C4 галогеналкил, C1-C4 галогеналкокси, фенил, бензил, пиридил, -OH, -NH₂, -F, -Cl, -Br, -I, -N₂ или -CN. В некоторых вариантах осуществления, заместители для циклоалкильной группы, такие как циклоалкильные группы, которые могут присутствовать в положениях, представленных R_1 и R_2 , представляют собой алкильные группы, такие как метильная или этильная группа. В некоторых вариантах осуществления, R_1 и R_2 оба представляют собой C3-C8 циклоалкильную группу, необязательно замещенную, по меньшей мере, одной алкильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразамид амид) представляет собой любое из соединений (1)-(18), как описано в публикации заявки на патент США № 20080119440.

В некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразид амид) представляет собой элескломол, структура которого следующая:



В некоторых вариантах осуществления, бис(тио-гидразид амид) представляет собой элеселомол или его аналог. Некоторые примеры подходящих аналогов представлены ниже:



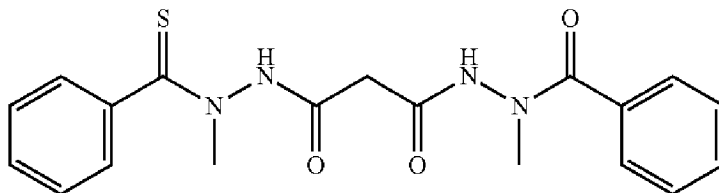
В некоторых аспектах, любое из бис(тиогидразидамидных) соединений, описанных в настоящем документе (например, элескломол или его аналог), используется совместно с любым из ингибиторов протеасом (например, бортезомибом, карфилзомибом, опмзомибом, иксазоинибом, деланзомибом или аналогом любого из них) для лечения субъекта, нуждающегося в лечении рака. Рак может быть резистентным к ингибитору протеасом. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе соединения бис(тиогидразидамида) (например, элескломол или его аналог) и ингибитор протеасом вводят в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления, их вводят отдельно. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение бис(тиогидразид амида) субъекту, который получил или должен получить одну или несколько доз ингибитора протеасом. Субъект, который, как ожидается, получит ингибитор протеасом, может быть тем, кому был назначен ингибитор протеасом или для которого план назначения или введения ингибитора протеасом был зафиксирован на материальном носителе поставщиком медицинских услуг субъекта, например, онкологом субъекта. В некоторых вариантах осуществления, ожидается, что субъект получит ингибитор протеасом в течение 4 недель после введения бис(тио-гидразид амида). В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибитора протеасом субъекту, который получил или должен получить одну или несколько доз бис(тио-гидразид амида). Субъект, который, как ожидается, получит бис(тио-гидразид амид), может быть тем, кому был назначен бис(тио-гидразид амид) или для которого был план назначения или введения бис(тио-гидразид амида) был зафиксирован на материальном носителе поставщиком медицинских услуг субъекта, например, онкологом субъекта. В некоторых вариантах осуществления, ожидается, что субъект получит бис(тио-гидразид амид) в течение 4 недель после введения ингибитора протеасом.

В некоторых вариантах осуществления, любое из соединений

бис(тиогидразидамида), описанных в настоящем документе (например, элескломол или его аналог), можно использовать совместно с любым одним или несколькими ингибиторами EGFR (например, гефитинибом, осимертинибом, ингибиторами тирозинкиназы или аналогом любого из них) для лечения субъекта, нуждающегося в лечении рака. Рак может быть резистентным к ингибитору EGFR. В некоторых вариантах осуществления, соединения бис(тио-гидразид амида), описанные в настоящем документе (например, элескломол или его аналог), и ингибитор EGFR вводят в одной и той же композиции. В других вариантах осуществления, их вводят отдельно. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение бис(тиогидразидамида) субъекту, который получил или предполагает получить одну или несколько доз ингибитора EGFR, например, субъекту, которому был назначен ингибитор EGFR, или для которого план назначения или введения ингибитора EGFR был зафиксирован на материальном носителе поставщиком медицинских услуг субъекта, например, онкологом субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления, можно ожидать, что субъект получит ингибитор EGFR в течение 4 недель после введения бис(тио-гидразид амида).

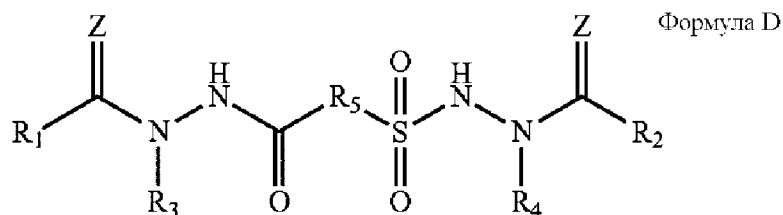
В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ингибитора EGFR субъекту, который получил или предполагает получить одну или несколько доз бис(тио-гидразид амида), например, субъекту, которому бис(тио-гидразид амид) был назначен или для которого план назначения или введения бис(тио-гидразид амида) был зафиксирован на материальном носителе поставщиком медицинских услуг субъекта, например, онкологом субъекта. В некоторых таких вариантах осуществления, ожидается, что субъект получит бис(тио-гидразид амид) в течение 4 недель после введения ингибитора EGFR.

В некоторых аспектах, предполагается использовать аналоги элескломолы, которые содержат одну группу C=S, для любых целей, описанных в настоящем документе для элескломолы. Например, одна из групп C=S в элескломоле или других бис(тио-гидразид амидах) вышеприведенной формулы A или B может быть заменена группой C=O. Например, в некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой следующее:



В некоторых вариантах осуществления, предполагается использовать соединения формулы (I), как представлено в публикации заявки на патент США № 20120065206 (US20120065206), для любых целей, для которых элескломол (или другой бис(тио-гидразид амид)) может быть использован как описано в настоящем документе. Такие соединения считаются аналогами элескломолы для целей настоящего изобретения. Такие соединения, которые можно назвать сульфонилгидразидными соединениями, изображены следующим

образом:

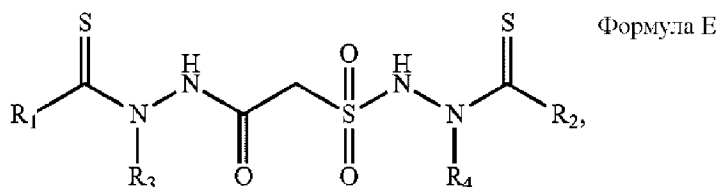


где каждый Z независимо представляет собой S, O или Se, при условии, что оба Z не могут быть O; каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила; необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного циклоалкенила, необязательно замещенной гетероциклической группы, где гетероциклическая группа связана с углеродом тиокарбонила через связь углерод-углерод, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-семи-членного моноциклического гетероарила, необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, в котором гетероарильная группа связана с углеродом тиокарбонила через связь углерод-углерод, --NR₁₂R₁₃, OR₁₄, --SR₁₄ и --S(O)_pR₁₅; R₃ и R₄ каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила, необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного циклоалкенила, необязательно замещенной гетероциклической группы и необязательно замещенной пяти-шести-членной арильной или гетероарильной группы; или R₁ и R₃ и/или R₂ и R₄ вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенную гетероциклическую группу или необязательно замещенную гетероарильную группу; R₅ представляет собой --CR₆R₇--, --C(=CHR₈)-- или --C(=NR₈)--; R₆ и R₇ оба представляют собой -H или необязательно замещенный низший алкил; R₈ выбран из группы, состоящей из -OH, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галоалкила, галоалкенила, галоалкинила, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-шести-членного моноциклического гетероарила, необязательно замещенного девяти-четырнадцатичленного бициклического гетероарила, необязательно замещенного циклоалкила или необязательно замещенного гетероцикла; --NR₁₀R₁₁ и --COR₉; R₉ представляет собой необязательно замещенный фенил, необязательно замещенный бициклический арил, необязательно замещенный пяти- или шести-членный моноциклический гетероарил, необязательно замещенный девяти-четырнадцати-членный бициклический гетероарил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный циклоалкил или необязательно замещенную гетероциклическую группу; R₁₀ и R₁₁ каждый независимо выбран из группы, состоящей из --H, --OH, amino, (ди)алкиламино, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галогеналкила, галогеналкенила, галогеналкинила, необязательно

замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-шестичленный моноциклический гетероарил, необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, необязательно замещенного циклоалкила или необязательно замещенной гетероциклической группы и --COR₉, или R₁₀ и R₁₁ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют пяти-шестичленную гетероарильную группу; и R₁₂, R₁₃ и R₁₄, каждый независимо, представляют собой --H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный фенил или необязательно замещенный бензил, или R₁₂ и R₁₃, взятые вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенную гетероциклическую группу или необязательно замещенную гетероарильную группу; R₁₅ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил, и p равно 1 или 2; при условии, что когда оба Z представляют собой S, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил, тогда R₁ и R₂ оба не являются незамещенным фенилом. В некоторых вариантах осуществления, R₁₀ и R₁₁ оба не представляют собой --H. В некоторых вариантах осуществления, предполагается использовать соединения приведенной выше формулы D, где оба Z представляют собой S, и R₃ и R₄ оба представляют собой метил, и R₁ и R₂ оба представляют собой незамещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления формулы D, по меньшей мере, один Z представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления формулы D, оба Z представляют собой S. В некоторых вариантах осуществления, предполагается использовать соединения формулы D, где оба Z представляют собой S, и R₃ и R₄ представляют собой метил, и R₁ и R₂ оба представляют собой низший алкил, например, циклопропил или метилциклопропил.

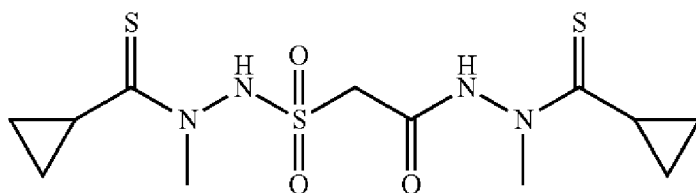
В некоторых вариантах осуществления, соединение может представлять собой любое из соединений 1-91, описанных в US 20120065206.

В некоторых вариантах осуществления, предполагается использовать соединения формулы D, где Z, R₁, R₂, R₃, R₄, R₇ и R₈ определены как для формулы A выше, для любых целей, для которых элескломол (или другой бис(тио-гидразид амид)) можно использовать, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую формулу:

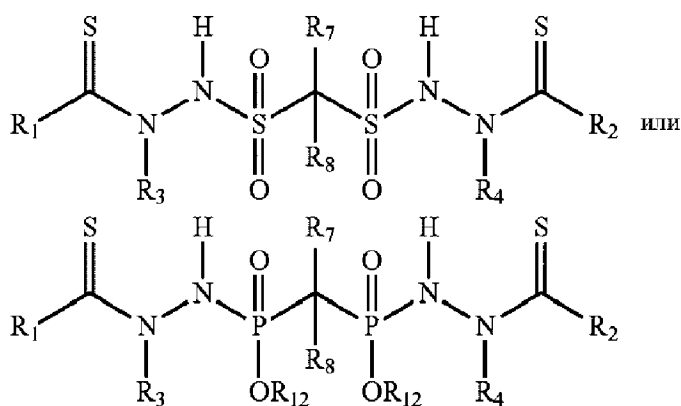


где R₁, R₂, R₃ и R₄ имеют значения, такие, как определены выше для формул A или D. В некоторых вариантах осуществления, R₁, R₂ или оба представляют собой фенил или низший алкил, например, метил, пропил, циклопропил или метилциклопропил. В некоторых вариантах осуществления, R₃, R₄ или оба представляют собой низший алкил, например метил. В некоторых вариантах осуществления, R₁ и R₂ являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, R₃ и R₄ являются одинаковыми. В некоторых

вариантах осуществления, соединение имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления, предполагается использовать соединения группы (I), (III), (IV), (VII), (X), (XI), (XII), (XIII) или (XIV), представленные в публикации заявки на патент США № 20150025042 для любых целей, для которых элескломол (или другой бис(тио-гидразид амид)) может быть использован, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, соединение содержит, по меньшей мере, одну группу C=S. В некоторых вариантах осуществления, соединение содержит две группы C=S. В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую формулу:



где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_7 , R_8 и R_{12} имеют значения, определенные в публикации заявки на патент США № 20150025042.

Следует понимать, что если описание относится к соединениям, описанным в конкретной публикации (например, в патенте, патентной заявке, журнальной статье и т. д.), такие соединения включают все различные роды, подроды и виды, описанные в такой ссылке.

В некоторых воплощениях соединение, которое избирательно ингибирует рост раковых клеток, представляет собой соединение, способное образовывать комплекс Cu(II) с медью. Не желая быть связанными какой-либо теорией, комплекс медь-агент может создавать опосредованный медью окислительный стресс. В некоторых вариантах осуществления, соединение, способное образовывать комплекс с медью, представляет собой бис(тиогидразид) амид или дитиокарбамат. В некоторых вариантах осуществления, соединение дополнительно или альтернативно способно образовывать комплекс с цинком.

В некоторых вариантах осуществления, соединение, которое селективно ингибирует рост раковых клеток, представляет собой агент, вызывающий повышенный уровень одной

или нескольких активных форм кислорода (ROS) в клетках, с которыми оно контактирует. ROS представляют собой химически реактивные молекулы, содержащие кислород. Примерами ROS являются пероксиды (например, пероксиды водорода), супероксид, гидроксильный радикал и синглетный кислород. Соединение, вызывающее повышенный уровень одной или нескольких ROS, может называться «индуктором ROS». Индуктор ROS может, например, ингибировать фермент или биологический путь или процесс, которые обычно ответственны за снижение ROS (например, превращение ROS в менее реактивные виды) или может активировать фермент или биологический путь или процесс, который увеличивает ROS в клетках. Повышенный уровень ROS часто приводит, среди прочего, к пероксислению липидов, которое может создавать многочисленные виды альдегидов, токсичных для клеток. В некоторых вариантах осуществления, соединение, которое селективно ингибирует рост раковых клеток, представляет собой агент, который является агентом, способствующим окислительному стрессу. Термин «агент, способствующий окислительному стрессу» относится к индукторам ROS и агентам, которые нарушают способность клетки или организма метаболизировать, ингибировать или удалять вредные виды, образующиеся в результате ROS. Например, агент, способствующий окислительному стрессу, может ингибировать фермент, такой как альдегид дегидрогеназа (ALDH), который обычно отвечает за превращение реактивных видов белка или липидов, образующихся в результате окисления ROS, в менее реактивную форму.

В некоторых вариантах осуществления, индуктор ROS представляет собой дитиокарбамат (например, дисульфирам или его аналог или активный метаболит) или бис(тио-гидразид амид) (например, элескломол или его аналог или активный метаболит). В некоторых вариантах осуществления, индуктором ROS является металл, такой как железо, медь, хром, ванадий и кобальт, который способен к окислительно-восстановительному циклу, при котором один электрон может быть принят или отдан металлом. Это действие катализирует образование реактивных радикалов и реактивных форм кислорода. В некоторых вариантах осуществления, индуктор ROS представляет собой соединение, которое образует комплекс с таким металлом.

В некоторых вариантах осуществления, соединение, которое селективно ингибирует рост раковых клеток, представляет собой ингибитор альдегид дегидрогеназы (ALDH). Альдегид дегидрогеназы катализируют необратимое окисление альдегидов до соответствующих им карбоновых кислот, тем самым защищая клетки от цитотоксичности, вызванной альдегидами. Надсемейство ALDH человека содержит 19 ALDH полипептидов: ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH1L1, ALDH1L2, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH8A1, ALDH9A1, ALDH16A1 и ALDH18A1. Эти ферменты катализируют окисление альдегида (например, эндогенно продуцируемого альдегида, такого как альдегиды, образующиеся в процессе метаболизма, или экзогенного альдегида) до соответствующей карбоновой кислоты в NAD^+ -зависимой или NADP^+ -зависимой реакции. Примеры аминокислотных последовательностей полипептидов ALDH (например,

последовательностей человека) и нуклеиновых кислот, которые их кодируют, известны в данной области техники и доступны в общедоступных базах данных, таких как база данных NCBI RefSeq.

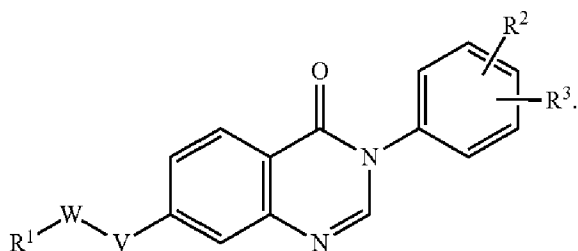
«Ингибитор ALDH» относится к агенту, который ингибирует экспрессию или активность, по меньшей мере, одного члена надсемейства ALDH. В некоторых вариантах осуществления любого из описанных в настоящем документе способов или композиций, относящихся к ингибиторам ALDH, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность одного или нескольких из ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH1L1, ALDH1L2, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH8A1, ALDH9A1, ALDH16A1 и ALDH18A1. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность одного или нескольких членов семейства ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, ALDH1B1, ALDH1L1 и ALDH1L2). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность, по меньшей мере, ALDH1A1. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность, по меньшей мере, ALDH1A2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность ALDH2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность одного или нескольких членов семейства ALDH3 (ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1 и ALDH3B2). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH8A1, ALDH9A1, ALDH16A1 и/или ALDH18A1. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует экспрессию и/или активность одного или нескольких членов семейства ALDH1 и ALDH2.

Ингибитор ALDH может содержать малую молекулу, нуклеиновую кислоту (например, миРНК, аптамер) или белок (например, антитело или полипептид, не являющийся антителом). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается с полипептидом ALDH и ингибирует его активность. В некоторых вариантах осуществления, связывание является обратимым. В некоторых вариантах осуществления, образуется стабильная ковалентная связь между ингибитором ALDH и ALDH. Например, может образоваться ковалентная связь с аминокислотой в активном центре фермента (например, Cys302). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH метаболизируется до одного или нескольких активных метаболитов, которые, по меньшей мере, частично опосредуют его ингибиторную активность. Любой из большого разнообразия ингибиторов ALDH известен в данной области и может быть использован в композициях и способах, описанных в настоящем документе. Дополнительную информацию относительно ALDH и некоторых ингибиторов ALDH можно найти у Коррака, V., et al., *Pharmacological Reviews*, (2012) 64: 520-539.

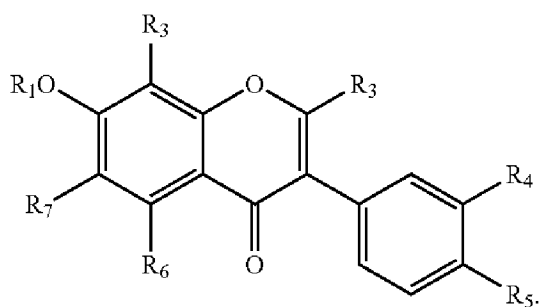
В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой дитиокарбамат, например, дисульфирам, или аналог или метаболит дитиокарбамата,

например, метаболит дисульфирама. Дисульфирам ингибирует ALDH1A1 и ALDH2. Метаболиты дисульфирама, которые являются ингибиторами ALDH, включают, например, NN-диэтилдитиокарбамат, S-метил NN-диэтилдитиокарбамат, S-метил N, N-диэтилдитиокарбамат сульфоксид, S-метил NN-диэтилтиокарбамат сульфоксид, S-метил NN-диэтилдитиокарбамат сульфон и S-метил метил-NN-диэтилтиокарбамат сульфон. Дисульфирам и некоторые другие ингибиторы ALDH используются в клинической практике при лечении алкоголизма. Употребление алкоголя пациентами, получающими лечение дисульфирамом, приводит к накоплению ацетальдегида, что приводит к ряду неприятных симптомов, отпугивающих пациента от употребления алкоголя. Дисульфирам также является ингибитором дофамин- β -гидроксилазы и используется при лечении кокаиновой зависимости.

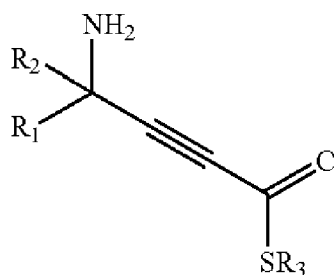
В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой производное хиназолинона, описанное в публикации заявки на патент США № 20080249116 следующей формулы, где R^1 , R^2 , R^3 , W и V такие, как описано в настоящем документе:



В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой соединение, описанное в публикации заявки на патент США № 20040068003 следующей формулы, где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и R_7 такие, как описано в ней:

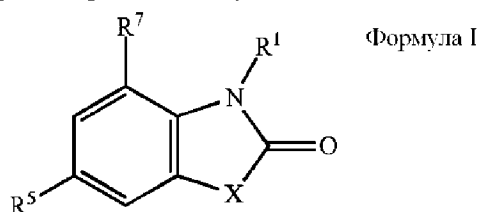


В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой соединение формулы:



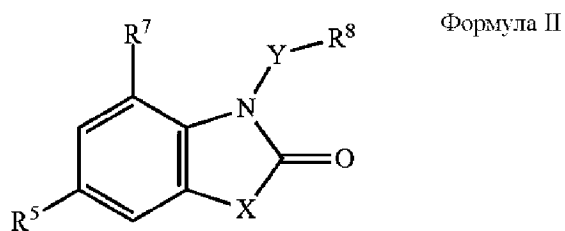
где R_1 , R_2 и R_3 независимо представляют собой замещенный или замещенный линейный или разветвленный C_1 - C_6 алкильный радикал или его соль.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой соединение, описанное в PCT/US2014/067943 (WO/2015/084731), озаглавленной ALDEHYDE DEHYDROGENASE INHIBITORS AND METHODS OF USE THEREOF). В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую Формулу I:



где X представляет собой O или $-C=O$; R^1 представляет собой H, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, арил, замещенный арил, гетероарил или замещенный гетероарил; R^5 представляет собой H, алкил, замещенный алкил, галоген, алкокси или замещенный алкокси; и R^7 представляет собой H или галоген.

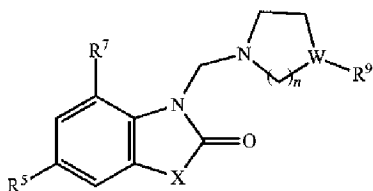
В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую Формулу II:



где X представляет собой O или $-C=O$; Y представляет собой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил или замещенный алкинил; R^5 представляет собой алкил, замещенный алкил, галоген, алкокси или замещенный алкокси; R^7 представляет собой H или галоген; и R^8 представляет собой циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, арил, замещенный арил, гетероарил или замещенный гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления, соединение имеет следующую Формулу III:

Формула III



где n равно 1 или 2; X представляет собой O или $-C=O$; W представляет собой N или O , и когда W представляет собой O , тогда R^9 отсутствует; R^5 представляет собой H , алкил, замещенный алкил, галоген, алкокси или замещенный алкокси; R^7 представляет собой ET или галоген; R^9 представляет собой H или $-(CH_2)_mR^{10}$, где m представляет собой целое число от 1 до 6; и R^{10} представляет собой H , циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, арил, замещенный арил, гетероарил или замещенный гетероарил.

Другие ингибиторы ALDH включают коприн, цианамид, 1-аминоциклопропанол (АСР), даидзин (т.е. 7-глюкозид 4',7-дигидроксиизофлавоны), CVT-10216 (3-[[[3-4-[(метилсульфонил)амино]фенил]-4-оксо-4Н-1-бензопиран-7-ил]окси]метил]бензойную кислоту; регистрационный номер CAS 1005334-57-5), цефалоспорины, противодиабетические сульфонилмочевины, метронидазол, диэтилдитиокарбамат, фенетилизотиоцианат (РЕИТС), прунетин (4% 5-дигидрокси-7-метоксиизофлавоны), 5-гидроксидаидзеин (генистеин), моногидрат трихлорацетальдегида (или хлораль), (S)-метилловый эфир 4-амино-4-метил-2-пентинтиоевой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH включает 4-амино-4-метил-2-пентин-1-аль (AMPAL) или 2-метил-5-(метилсульфанил)-5-оксопентан-2-аминий, которые являются необратимыми ингибиторами ферментов ALDH1 и ALDH3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH включает беномил (метил-[1-[(бутиламино)карбонил]-1Н-бензимидазол-2-ил]карбамат). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой пероральное гипогликемическое средство, такое как хлорпропамид или толбутамид. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой госсипол или его аналог. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой 2,2'-бис-(формил-1,6,7-тригидрокси-5-изопропил-3-метилнафталин). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой соединение с любым из следующих регистрационных номеров CAS: 1069117-57-2, 1069117-56-1, 1069117-55-0, 1055417-23-6, 1055417-22-5, 1055417-21-4, 1055417-20-3, 1055417-19-0, 1055417-18-9, 1055417-17-8, 1055417-16-7, 1055417-15-6 и 1055417-13-4.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH представляет собой ароматический лактон, описанный Buchman, CD, *et al.*, *Chemico-Biological Interactions* (2015) 234:38-44.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH содержит нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию или активность гена ALDH. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота представляет собой РНК (агент (например, миРНК), который ингибирует экспрессию гена ALDH. Примеры ингибиторов ALDH на

основе нуклеиновых кислот и содержащие их составы описаны в публикации патента США № 20140248338.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH является селективным в отношении одного или нескольких ферментов ALDH по сравнению с одним или несколькими другими ферментами ALDH. Как используется в настоящем документе, ингибитор считается селективным в отношении первого фермента по сравнению со вторым ферментом, если IC₅₀ агента для первого фермента, по меньшей мере, в 5 раз ниже, чем IC₅₀ агента для второго фермента. В некоторых вариантах осуществления, разница в значениях IC₅₀ составляет, по меньшей мере, 10 раз, по меньшей мере, 100 раз или, по меньшей мере, 1000 раз. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH является селективным в отношении одного или нескольких членов семейства ALDH1 (например, ALDH1A1) по сравнению с ALDH2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH является селективным в отношении одного или нескольких членов семейства ALDH1 (например, ALDH1A1) и в отношении ALDH2 по сравнению с, по меньшей мере, некоторыми другими членами надсемейства ALDH (например, ALDH3A1). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH является селективным в отношении одного или нескольких ферментов ALDH по сравнению с другими дегидрогеназами, такими как 15-гидроксипростагландиндегидрогеназа (HPGD) и гидроксистероиддегидрогеназа типа 4 (HSD17β4), HPGD и HSD17β4,

В некоторых вариантах осуществления любых композиций или способов, описанных в настоящем документе, которые относятся к ингибитору ALDH, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом надсемейства ALDH с K_d ≤ 100 нМ, например, 50 нМ-100 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним полипептидом ALDH с K_d ≤ 50 нМ, например, 10 нМ-50 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом надсемейства ALDH с K_d ≤ 10 нМ, например, 1 нМ-10 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом надсемейства ALDH с K_d < 1 нМ, например, от 0,1 нМ до 1 нМ или от 0,01 нМ до 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом семейства ALDH1 с K_d ≤ 100 нМ, например, от 50 нМ до 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом семейства ALDH1 с K_d ≤ 50 нМ, например, 10 нМ-50 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом семейства ALDH1 с K_d ≤ 10 нМ, например, 1 нМ-10 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается, по меньшей мере, с одним членом семейства ALDH1 с K_d ≤ 1 нМ, например, от 0,1 нМ до 1 нМ или от 0,01 нМ до 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается с ALDH2 с K_d ≤ 100 нМ, например, от 50 нМ до 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается с ALDH2 с K_d ≤ 50 нМ, например, 10 нМ-50 нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается с ALDH2 с K_d ≤ 10 нМ, например, 1 нМ-10

нМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH связывается с ALDH2 с $K_d \leq 1$ нМ, например, от 0,1 нМ до 1 нМ или от 0,01 нМ до 0,1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций или способов, описанных в настоящем документе, которые относятся к ингибитору ALDH, ингибитор ALDH ингибирует один или несколько полипептидов ALDH с IC_{50} 1 нМ-5 мкМ, например, 1 нМ-5 нМ, 5 нМ-10 нМ, 10 нМ-20 нМ, 20 нМ-30 нМ, 30 нМ-50 нМ, 50 нМ-100 нМ, 100 нМ-500 нМ, 500 нМ-1 мкМ или 1-5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует один или несколько полипептидов ALDH1 с IC_{50} 1 нМ-5 мкМ, например, 1 нМ-5 нМ, 5 нМ-10 нМ, 10 нМ-20 нМ, 20 нМ-30 нМ, 30 нМ-50 нМ, 50 нМ-100 нМ, 100 нМ-500 нМ, 500 нМ-1 мкМ или 1 мкМ-5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует ALDH1A1 с IC_{50} 1 нМ-5 мкМ, например, 1 нМ-5 нМ, 5 нМ-10 нМ, 10 нМ-20 нМ, 20 нМ-30 нМ, 30 нМ-50 нМ, 50 нМ-100 нМ, 100 нМ-500 нМ, 500 нМ-1 мкМ или 1 мкМ-5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует ALDH1A2 с IC_{50} 1 нМ-5 мкМ, например, 1 нМ-5 нМ, 5 нМ-10 нМ, 10 нМ-20 нМ, 20 нМ-30 нМ, 30 нМ-50 нМ, 50 нМ-100 нМ, 100 нМ-500 нМ, 500 нМ-1 мкМ или 1 мкМ-5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ALDH ингибирует ALDH2 с IC_{50} 1 нМ-5 мкМ, например, 1 нМ-5 нМ, 5 нМ-10 нМ, 10 нМ-20 нМ, 20 нМ-30 нМ, 30 нМ-50 нМ, 50 нМ-100 нМ, 100 нМ-500 нМ, 500 нМ-1 мкМ или 1 мкМ-5 мкМ.

Способы ингибирования роста и пролиферации опухоли

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы, относящиеся к ингибированию роста и/или пролиферации опухоли, которые включают определение уровня биомаркера в образце опухоли, содержащем опухолевые клетки, и контакт опухоли с терапевтическим соединением, если, по меньшей мере, пороговая часть образца имеет уровень биомаркера. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение, используемое для контакта с опухолью, представляет собой ионофор меди. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой липоилированный белок. Типовые биомаркеры липоилированного белка перечислены в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой митохондриальный белок. В некоторых вариантах осуществления, митохондриальный белок участвует в биосинтезе липоевой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, митохондриальный белок представляет собой кластерный белок железо-сера. В некоторых вариантах осуществления, митохондриальный белок представляет собой митохондриальный белок Комплекса I. Примеры митохондриальных генов, кодирующих соответствующие биомаркеры митохондриальных белков, перечислены в таблице 3.

Таблица 2. Примеры биомаркеров липоилированного белка

Липоилированный белок	Функция
Липоил-DLAT	Комплекс пируватдегидрогеназы
Липоил-DLST	Комплекс альфа-кетоглутаратдегидрогеназы

Липоил-GCSH	Система расщепления глицина
Липоил-DBT	Комплекс дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью

Таблица 3. Примеры митохондриальных генов соответствующих биомаркеров митохондриальных белков

Имя гена	Функция
FDX1	Путь кластера Fe-S
ALDH1	Окисление альдегидов
ALDH2	Окисление альдегидов
LIAS	Путь липоевой кислоты
LIPT1	Путь липоевой кислоты
LIPT2	Путь липоевой кислоты
DLD	Путь липоевой кислоты
NDUFB6	Комплекс I
NDUFC2	Комплекс I
NDUFA6	Комплекс I
NDUFS1	Комплекс I
ISCA2	Путь кластера Fe-S
PDHB	Пируватдегидрогеназа
NDUFS8	Комплекс I
NDUFA2	Комплекс I
NDUFS3	Комплекс I
NDUFA9	Комплекс I
NDUFV1	Комплекс I
NDUFS2	Комплекс I
NDUFB8	Комплекс I
NDUFV2	Комплекс I
NDUFB11	Комплекс I
NDUFC1	Комплекс I
CNGA2	Циклический управляемый нуклеотидом ионный канал
PLOD1	Гидроксилирование лизина

ST6GAL2	Сиалилтрансфераза
ABCA13	Кассета связывания АТФ
GLRX5	Путь кластера Fe-S

В некоторых вариантах осуществления, способ включает определение уровня липоилирования белка (*например*, липоил-DLAT (липоил-дигидролипоамацетилтрансфераза), липоил-DLST (липоил-дигидролипоилсукцинилтрансфераза), липоил-GCSH (белок H системы расщепления липоил-глицин), липоил-DBT (трансацилаза E2 липоил-дигидролипоамада с разветвленной цепью) или любая их комбинация) в образце опухоли и контакт опухоли с терапевтическим соединением, если уровень липоилирования белка в образце выше порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления, способ включает определение уровня липоилирования белка (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT или любой их комбинации) и определение уровня экспрессии белка митохондрий (*например*, FDX1 (ферредоксин 1), ALDH1A1 (альдегиддегидрогеназа A1), ALDH2 (альдегиддегидрогеназа 2), LIAS (синтетаза липоевой кислоты), LIPT1 (липоилтрансфераза 1), LIPT2 (липоилтрансфераза 2), DLD (дигидролипоамиддегидрогеназа) (или любая их комбинация) в образце опухоли и контакт опухоли с терапевтическим соединением, если уровень липоилирования белка в образце выше порогового уровня и если уровень экспрессии митохондриального белка в образце выше порогового уровня.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих липоил-DLAT в образце, соблюдается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют липоил-DLAT.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих липоил-DLST, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют липоил-DLST.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих липоил-GCSH, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют липоил-GCSH.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих липоил-DBT в образце, соблюдается, если, по

меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют липоил-DBT.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих FDX1, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют FDX1.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH1, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют ALDH1.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH2 в образце, достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют ALDH2.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих LIAS, в образце соблюдается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют LIAS.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих LIPT1, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют LIPT1.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих LIPT2, в образце достигается, если, по меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют LIPT2.

В некоторых вариантах осуществления, пороговый уровень общего количества опухолевых клеток, экспрессирующих DLD в образце, достигается, если по, меньшей мере, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% образца экспрессируют DLD.

В некоторых вариантах осуществления, в способах, представленных в настоящем документе, можно использовать любой анализ, способный обнаруживать экспрессию соответствующего биомаркера. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают путем иммуноокрашивания меченым антителом, которое связывается с эпитопом биомаркера. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают с помощью иммуногистохимии. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают с помощью вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления, мРНК биомаркера обнаруживают с помощью количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают с помощью микроскопии (*например*, флуоресцентной микроскопии). В некоторых вариантах осуществления, биомаркер обнаруживают с помощью ELISA.

Любое из множества антител можно использовать в способах обнаружения. Такие антитела включают, например, поликлональные, моноклональные (mAb), рекомбинантные, гуманизированные или частично гуманизированные, одноцепочечные, Fab и их фрагменты. Антитела могут быть любого изотипа, например, IgM, различные изотипы IgG, такие как IgG1, IgG2a и т.д., и они могут быть от любых видов животных, которые продуцируют антитела, включая козу, кролика, мышь, курицу или подобных. Термин «антитело, специфичное к» белку означает, что антитело распознает определенную последовательность аминокислот или эпитоп в белке и селективно связывается с белком, а не с белками, не предназначенными для связывания с антителом. Параметры, необходимые для достижения специфического связывания, можно определить обычным образом с использованием общепринятых в данной области способов.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, специфичные в отношении биомаркера (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT, FDX1, ALDH1, ALDH2, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD), иммобилизованы на поверхности (*например*, являются реактивными элементами на матрице, такой как микроматрица, или находятся на другой поверхности, *например*, используемой для технологии на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR), такой как Biacore), и белки в образце обнаруживаются благодаря их способности специфически связываться с антителами. Альтернативно, белки в образце могут быть иммобилизованы на поверхности и обнаружены благодаря их способности специфически связываться с антителами. Способы подготовки поверхностей и проведения анализов, включая условия, эффективные для специфического связывания, являются обычными и хорошо известны в данной области техники.

Среди множества типов подходящих иммуноанализов можно назвать иммуногистохимическое окрашивание, ELISA, вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг), иммунопреципитацию, радиоиммуноанализ (RIA), сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и т. д. В некоторых вариантах осуществления, анализы, используемые в способах, представленных в настоящем документе, могут быть основаны на колориметрических показаниях, флуоресцентных показаниях, масс-спектропии, визуальном осмотре и т. д.

Как упоминалось выше, уровни экспрессии биомаркера можно измерить путем измерения количества нуклеиновой кислоты (например, количества мРНК и/или геномной ДНК). Определение количества нуклеиновой кислоты может быть выполнено различными способами, известными практически специалистам в данной области техники. Например, уровни экспрессии нуклеиновых кислот, вариантов альтернативного сплайсинга, хромосомной перестройки и количества копий гена можно определить с помощью микроматричного анализа (см., например, патенты США №№ 6,913,879, 7,364,848, 7,378,245, 6,893,837 и 6,004,755) и количественной ПЦР. Изменения числа копий могут быть обнаружены, например, с помощью анализа полногеномного генотипирования Illumina Infinium II или Agilent Human Genome CGH Microarray (Steemers et al., 2006). Примеры способов измерения количества мРНК включают полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), включая ПЦР в реальном времени, микроматричный анализ, нанострочный анализ, нозерн-блоттинг, дифференциальную гибридизацию и анализ защиты от рибонуклеазы. Такие способы хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, current edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & sons, New York, N.Y.

Способы лечения рака

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены способы лечения рака у субъекта путем введения субъекту терапевтического соединения в соответствии со способом, представленным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение представляет собой ионофор меди. В некоторых вариантах осуществления, способы описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения любых раковых, предраковых опухолей и/или иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления, контакт опухоли и/или иммунной клетки с ионофором меди ингибирует комплекс пируватдегидрогеназы, комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекс дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью и/или расщепление глицина. В некоторых вариантах осуществления, ионофор меди предварительно нагружен (например, предварительно закомплексован) с медью (II).

В некоторых вариантах осуществления, рак включает солидную опухоль. Раковые заболевания, которые можно лечить с помощью способов и композиций, представленных в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, раковые клетки из мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, толстой кишки,

пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, яичек, языка или матки. Кроме того, рак может конкретно относиться к следующему гистологическому типу, хотя он не ограничен ими: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома недифференцированная; гигантская и веретеноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатричная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидно-кистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный полипоз толстой кишки; твердая карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометриоидная карцинома; карцинома придатков кожи; апокриновая аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтрирующая карцинома протоков; медуллярная карцинома; дольковая карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета молочной железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; злокачественная тимома; злокачественная стромальная опухоль яичников; злокачественная текома; злокачественная зернистоклеточная опухоль; и злокачественная робластома; карцинома из клеток Сертоли; злокачественная опухоль из клеток Лейдига; злокачественная опухоль жировых клеток; злокачественная параганглиома; злокачественная экстрамаммарная параганглиома; феохромоцитома; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментном невусе; эпителиоидноклеточная меланома; злокачественный синий невус; саркома; фибросаркома; злокачественная фиброзная гистиоцитома; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; злокачественная смешанная опухоль; мюллеровская смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; злокачественная мезенхимома; злокачественная опухоль Бреннера; злокачественная филлоидная опухоль; синовиальная саркома; злокачественная мезотелиома; дисгермиома; эмбриональная карцинома; злокачественная тератома; злокачественный зоб яичников; хориокарцинома; злокачественная мезонефрома;

гемангиосаркома; злокачественная гемангиоэндотелиома; саркома Капоши; злокачественная гемангиоперицитома; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; злокачественная хондробластома; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; злокачественная одонтогенная опухоль; амелобластная одонтосаркома; злокачественная амелобластома; амелобластная фибросаркома; злокачественная пинеалома; хордома; злокачественная глиома; эпендимома; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; обонятельная нейрогенная опухоль; злокачественная менигиома; нейрофибросаркома; злокачественная неврилеммома; злокачественная зернистоклеточная опухоль; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; лимфома Ходжкина; парагранулема; малая лимфоцитарная злокачественная лимфома; диффузная крупноклеточная злокачественная лимфома; фолликулярная злокачественная лимфома; грибовидный микоз; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомклеточный лейкоз; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз.

Фактические уровни доз терапевтического соединения можно варьировать, чтобы получить количество, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являющееся токсичным для пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого агента, способ введения, время введения, скорость выведения или метаболизма конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретным используемым соединением, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, проходящего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтическое соединение, описанное в настоящем документе, можно вводить совместно с противораковым средством, *например*, химиотерапевтическими средствами, ингибиторами иммунных контрольных точек и/или ингибиторами протеасом. Способы лечения можно применять в сочетании с другими формами традиционной терапии (*например*, стандартными способами лечения рака, хорошо известными специалистам в данной области техники), либо последовательно с, до или после традиционной терапии. Например, эти модулирующие агенты можно вводить с терапевтически эффективной дозой химиотерапевтического агента. В другом варианте

осуществления, эти модулирующие агенты можно вводить в комбинации с химиотерапией для повышения активности и эффективности химиотерапевтического агента. В некоторых описанных в настоящем документе аспектах, терапевтическое соединение можно вводить совместно с ингибитором иммунной контрольной точки. Терапия ингибиторами контрольных точек таргетирует ключевые регуляторы иммунной системы, которые либо стимулируют, либо ингибируют иммунный ответ. Такие иммунные контрольные точки можно использовать при раковых заболеваниях (*например*, при опухолях) для ускользания от атак иммунной системы. В некоторых описанных в настоящем документе аспектах, терапевтическое соединение можно вводить совместно с ингибитором протеасом.

В некоторых вариантах осуществления, способ лечения или профилактики рака (*например*, рака молочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого, рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака яичников, меланомы и рака почки) может включать введение соединения совместно с одним или несколькими другими химиотерапевтическими агентами. Химиотерапевтические агенты, которые можно вводить совместно с терапевтическими соединениями, включают: АВТ-263, дималеат афатиниба, аминоклутетимид, амсакрин, анастрозол, аспарагиназу, акситиниб, ингибиторы b-raf (*например*, вемурафениб, дабрафениб), вакцину *Bacillus Calmette-Guérin* (bcb), бевацизумаб, BEZ235, бикалутамид, блеомицин, бортезомиб, бусерелин, бусульфид, кабозантиниб, кампотедин, капецитабин, карбоплатин, карфилзомиб, кармустин, церитиниб, хлорамбуцил, хлорохин, цисплатин, кладрибин, клодронат, кобиметиниб, колхицин, кризотиниб, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, дабрафениб, дакарбазин, дактиномицин, даунорубин, деметоксивиридин, дексаметазон, дихлорацетат, диенэстрол, диэтилстильбэстрол, доцетаксел, доксорубин, ингибиторы EGFR (*например*, ингибиторы тирозинкиназы, гефитиниб, осимертиниб), эпирубин, эрибулин, эрлотиниб, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, эверолимус, экземестан, филграстин, флударабин, флуорокортизон, фторурацил и 5-фторурацил, флуоксиместерон, флутамид, гефитиниб, гемцитабин, генистеин, гозерелин, GSK1120212, гидроксимочевину, идарубин, ифосфамид, иматиниб, интерферон, иринотекан, иксабепилон, леналидомид, летрозол, лейковорин, лейпролид, левамизол, ломустин, лонидамин, мехлорэтамин, медроксипрогестерон, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, месна, метформин, метотрексат, милтефодин, MK2206, митомицин, митотан, митоксантрон, мутамицин, нилутамид, нокадазол, октреотид, олапариб, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат, пазопаниб, пеметрексед, пентостатин, перифозин, PF-04691502, пликамицин, помалидомпицин, порфирин, прокарбазин, ралтитрексед, рамуцирумаб, ритуксимаб, ромидеписин, рукапариб, селуметиниб, сиролимус, сорафениб, стрептозоцин, сунитиниб, сурамин, талазопариб, тамоксифен, темозоломид, темсиролимус, тенипозид, тестостерон, талидомид, тиогуанин, тиотепа, титаноцена дихлорид, топотекан, траметиниб, трастузумаб, третиноин, вемурафениб, велипариб, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин и вориностат (SANA). Например, химиотерапевтические агенты, которые можно вводить совместно с

терапевтическими соединениями, включают: аминоглутетимид, амсакрин, анастрозол, аспарагиназу, bcr, бикалутамид, блеомицин, бортезомиб, бусерелин, бусульфан, кампотecin, капецитабин, карбоплатин, карфилзомиб, кармустин, хлорамбуцил, хлорохин, цисплатин, кладрибин, клодронат, колхицин, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даунорубин, деметоксивиридин, дихлорацетат, диэнострол, диэтилстильбэстрол, доцетаксел, доксорубин, эпирубин, эстрадиол, эстрамустин, этопозид, эверолимус, экземестан, филграстим, флударабин, флуорокортизон, фторурацил, флуоксиместерон, флутамид, гемцитабин, генистеин, гозерелин, гидроксимочевину, идарубин, ифосфамид, иматиниб, интерферон, иринотекан, иронотекан, леналидомид, летрозол, лейковорин, лейпролид, левамизол, ломустин, лонидамин, мехлорэтамин, медроксипрогестерон, мегестрол, мелфаллан, мерскаптопурин, метформин, метотрексат, митомицин, митотан, митоксантрон, нилутамид, нокодазол, октреотид, оксалиплатин, паклитаксел, памидронат, пентостатин, перифозин, пликамицин, помалидомид, порфимер, прокарбазин, ралтитрексед, ритуксимаб, сорафениб, стрептозоцин, сунитиниб, сурамин, тамоксифен, темозоломид, темсиролимуc, тенипозид, тестостерон, талидомид, тиогуанин, тиотепа, титаноцена дихлорид, топотекан, трастузумаб, третиноин, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин. В других вариантах осуществления, химиотерапевтические агенты, которые можно вводить совместно с терапевтическими соединениями, включают: АВТ-263, дексаметазон, 5-фторурацил, PF-04691502, ромидепсин и вориностат (SANA). В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, химиотерапевтический агент, вводимый совместно с терапевтическими соединениями, представляет собой таксановый химиотерапевтический агент, такой как паклитаксел или доцетаксел. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, химиотерапевтический агент, вводимый совместно с терапевтическими соединениями, представляет собой доксорубин. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, терапевтическое соединение вводят совместно с таксановым химиотерапевтическим агентом (например, паклитакселем) и доксорубином.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложена противораковая композиция, содержащая противораковый агент, идентифицированный способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, противораковая композиция дополнительно содержит ингибитор протеасомы, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеасомы представляет собой бортезомиб, карфилзомиб, опророзомиб, иксазомиб, деланзомиб или аналог любого из них.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибитора иммунной контрольной точки, например, антитела, которое связывается с PD-1, PD-L1, CTLA-4 или другим белком иммунной контрольной точки.

В некоторых вариантах осуществления, ионофор меди усиливает гибель опухолевых клеток и/или гибель иммунных клеток противоракового агента по сравнению с только

противораковым агентом.

Способы скрининга противораковых агентов

Некоторые аспекты описания предлагают способ скрининга одного или нескольких тестируемых агентов для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий контакт образца клетки (например, раковой клетки) с тестируемым агентом, измерение липоилированного белка (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT) и идентификацию тестируемого агента как противоракового агента-кандидата, если уровень липоилированного белка снижен по сравнению с уровнем липоилированного белка соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом. Уровень липоилированного белка в соответствующем образце клеток, не контактировавшем с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который, в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма. В некоторых вариантах осуществления, образец клеток, не контактировавший с тестируемым агентом, не экспрессирует липоилированный белок или содержит пониженный уровень липоилированного белка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, тестируемый агент идентифицируется как противораковый агент-кандидат, если уровень липоилированного белка (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT) снижен, по меньшей мере, на примерно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 90%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тестируемый агент идентифицируется как противораковый агент-кандидат, если уровень липоилированного белка (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH, липоил-DBT) снижен, по меньшей мере, в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение уровня или активности митохондриального белка (*например*, FDX1, ALDHA1, ALDH2, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD) проконтактировавшего образца клеток и определение того, снизился ли уровень или активность митохондриального белка проконтактировавшей клетки по сравнению с уровнем или активностью митохондриального белка соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом.

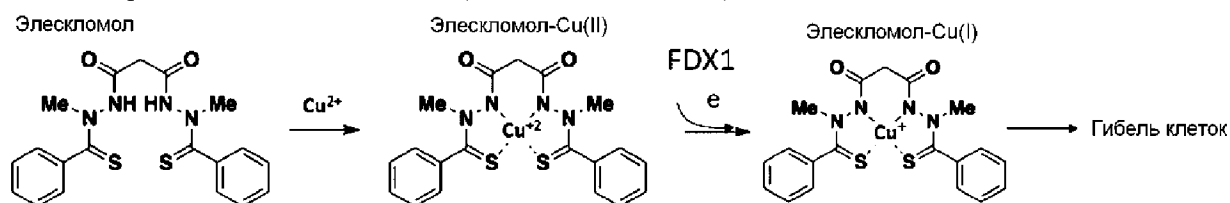
В некоторых вариантах осуществления изобретения, тестируемый агент идентифицируется как противораковый агент-кандидат, если уровень или активность митохондриального белка (*например*, FDX1, ALDHA1, ALDH2, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD, DLAT, DLST, DBT, GSH, пируватдегидрогеназы, комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекса дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью, комплекса расщепления глицина) снижен на, по меньшей мере, примерно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 90%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тестируемый агент идентифицируется как противораковый агент-кандидат, если уровень или активность митохондриального белка (*например*, FDX1, ALDHA1, ALDH2, LIAS,

LIPT1, LIPT2, DLD, DLAT, DLST, DBT, GSH, пируватдегидрогеназы, комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекса дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью, комплекса расщепления глицина) снижен, по меньшей мере, в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более.

В некоторых вариантах осуществления, любой анализ, способный определять экспрессию соответствующего белка (*например*, липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GSH, липоил-DBT, FDX1, ALDH1, ALDH2, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD, DLAT, DLST, DBT, GSH, пируватдегидрогеназы, комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекса дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью, комплекса расщепления глицина) может быть использован в способах, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают путем иммуноокрашивания меченым антителом, которое связывается с эпитопом белка. В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают с помощью иммуногистохимии. В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают вестерн-блоттингом. В некоторых вариантах осуществления, мРНК белков обнаруживают с помощью количественной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают с помощью микроскопии (*например*, флуоресцентной микроскопии). В некоторых вариантах осуществления, белки обнаруживают с помощью ELISA.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает измерение гибели клеток проконтактировавшего образца клеток и определение того, увеличивается ли гибель клеток проконтактировавшего образца по сравнению с гибелью клеток соответствующего образца клеток не контактировавшего с тестируемым агентом. Уровень гибели клеток соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который, в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма.

Например, восстановление Cu(II), связанной с элескломол с помощью FDX1, до токсичной формы Cu(I) способствует гибели клеток в состоянии повышенного митохондриального метаболизма (как показано ниже).



В некоторых вариантах осуществления, любой анализ, способный выявить гибель клеток после обработки тестируемым агентом, может быть использован в способах, представленных в настоящем документе. Гибель клеток обычно характеризуется вздутием мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение

любого из этих действий на раковые клетки указывает на то, что конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) полезен при лечении рака.

Жизнеспособность клеток можно измерить, определяя поглощение клеткой красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий или синий ALAMAR™ (см., например, Page et al., 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). В таком анализе, клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, клетки промывают и спектрофотометрически измеряют оставшийся краситель, отражающий поглощение красителя клеткой. Связывающий белок краситель сульфородамин В (SRB) также можно использовать для измерения цитотоксичности (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

Альтернативно, соль тетразолия, такая как МТТ, используется в количественном колориметрическом анализе выживания и пролиферации клеток млекопитающих путем обнаружения живых, но не мертвых, клеток (см., например, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55- 63).

Гибель клеток можно количественно оценить, измеряя, например, фрагментацию ДНК. Доступны коммерческие фотометрические способы количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких анализов, включая TUNEL (определяющий включение меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и анализы на основе ELISA, описаны в Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Гибель клеток также можно определить путем измерения морфологических изменений в клетке. Например, как и при некрозе, потерю целостности плазматической мембраны можно определить путем измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения числа мертвых клеток описан Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Клетки также можно пометить ДНК-красителем (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или йодидом пропидия) и наблюдать за клетками на предмет конденсации хроматина и скоплению лейкоцитов по периферии участка воспаления вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые могут быть измерены для определения гибели клеток, включают, например, конденсацию цитоплазмы, повышенное вздутие мембраны и клеточное сморщивание.

Наличие гибели клеток можно измерить как в прикрепленных, так и в «плавающих» компартментах культур. Например, оба компартмента можно собрать, удаляя супернатант, трипсинизируя прикрепленные клетки, объединяя препараты после стадии промывки центрифугированием (например, 10 минут при 2000 об/мин) и обнаруживая гибель клеток (например, путем измерения фрагментации ДНК). (См., например, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

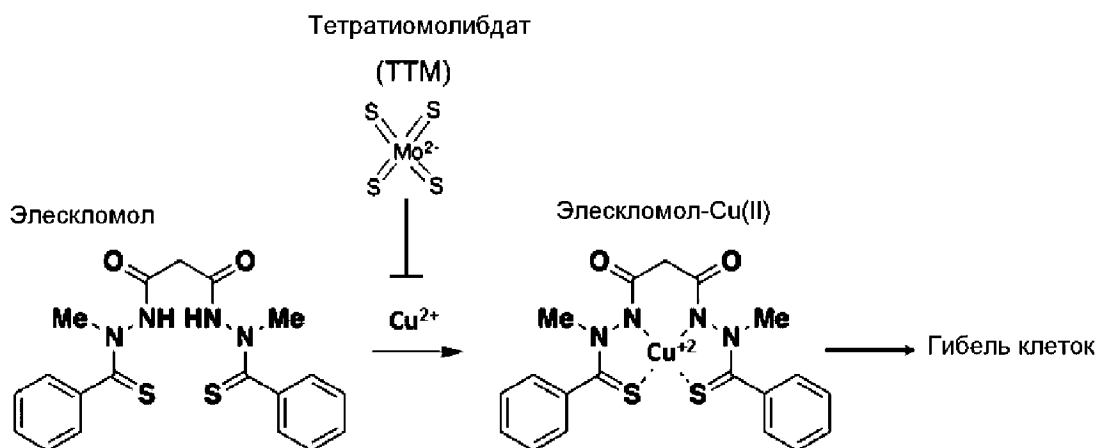
В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ определения повышенного митохондриального метаболизма в опухоли и/или иммунной клетке, включающий окрашивание на липоевую кислоту в опухоли и/или иммунной клетке.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации

противоракового агента-кандидата, включающий стадии (а) инкубации клеточного образца со средой с добавлением меди; (b) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (с) измерения жизнеспособности клеток в образце клеток; и (d) идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень жизнеспособности клеток снижен по сравнению с уровнем жизнеспособности клеток образца клеток, инкубированного со средой с добавлением меди и не контактировавшего с тестируемым агентом. Уровень жизнеспособности клеток соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии (а) инкубации клеточного образца с хелатором меди; (b) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (с) измерения гибели клеток в образце клеток; и (d) идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень гибели клеток снижен по сравнению с уровнем гибели клеток образца клеток, инкубированного с хелатором меди и не контактировавшего с тестируемым агентом. Уровень клеточной гибели соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма.

В некоторых вариантах осуществления, хелатор меди представляет собой тетратиомолибдат (ТТМ). Пример хелатирования меди с помощью ТТМ показан ниже.



В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии (а) инкубации образца клеток со средой с добавлением металлов; (b) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (с) измерения жизнеспособности клеток в образце клеток; и (d) идентификации тестируемого

агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень жизнеспособности клеток снижен по сравнению с уровнем жизнеспособности клеток в образце клеток, инкубированном со средой с добавлением металла и не контактировавшем с тестируемым агентом.

В одном варианте осуществления, среда с добавкой металла представляет собой среду с добавкой цинка (среду с добавкой Zn). В другом варианте осуществления, среда с добавкой металла представляет собой среду с добавкой марганца (среду с добавкой Mn). В другом варианте осуществления, среда с добавкой металла представляет собой среду с добавкой кобальта (среду с добавкой Co). В еще одном варианте осуществления, среда с добавкой металла представляет собой среду с добавкой никеля (среду с добавкой Ni). В еще одном варианте осуществления, среда с добавкой металла представляет собой среду с добавкой железа (среду с добавкой Fe).

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии (a) инкубации клеточного образца с хелатором металлов; (b) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (c) измерения гибели клеток в образце клеток; и (d) идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень гибели клеток снижен по сравнению с уровнем гибели клеток в образце клеток, инкубированном с хелатором металла и не контактировавшем с тестируемым агентом.

В одном варианте осуществления, хелатор металла представляет собой хелатор цинка (Zn). В другом варианте осуществления, хелатор металла представляет собой хелатор марганца (Mn). В другом варианте осуществления, хелатор металла представляет собой хелатор кобальта (Co). В еще одном варианте осуществления, хелатор металла представляет собой хелатор никеля (Ni). В еще одном варианте осуществления, хелатор металла представляет собой хелатор железа (Fe).

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии (a) инкубации образца клеток со средой с добавлением глюкозы; (b) удаления среды с добавлением глюкозы и последующего инкубирования образца клеток со средой с добавлением галактозы; (c) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (d) измерения жизнеспособности клеток в образце клеток; и (e) идентификации тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень жизнеспособности клеток снижен по сравнению с уровнем жизнеспособности клеток в образце клеток, сначала инкубированном в среде с добавлением глюкозы, затем инкубированном в среде с добавлением галактозы после удаления среды с добавлением глюкозы, и не контактировавшем с тестируемым агентом. Уровень клеточной гибели соответствующего образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который, в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии (a) инкубации образца клеток в среде, где образец клеток содержит делецию в гене, кодирующем митохондриальный белок; (b) контакта образца клеток с тестируемым агентом; (c) измерения жизнеспособности клеток в образце клеток; и (d) идентификации тестируемого агента в качестве кандидата противоракового агента, если уровень клеточной жизнеспособности повышен по сравнению с уровнем клеточной жизнеспособности образца клеток, не содержащего делеции в гене, кодирующем митохондриальный белок, и контактировавшего с тестируемым агентом. В некоторых вариантах осуществления, митохондриальный белок представляет собой ферредоксин 1 (FDX1). Уровень клеточной жизнеспособности соответствующего образца клеток, содержащего делецию в гене, кодирующем митохондриальный белок, и контактировавшего с тестируемым агентом, может быть любым подходящим эталоном, таким как контрольный образец или эталонный образец, который, в некоторых вариантах осуществления, может быть типовым для нормального митохондриального метаболизма, и в других вариантах осуществления, может быть типовым для повышенного митохондриального метаболизма.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, содержащий тестируемый агент и анализ для измерения липоилирования клеточного белка.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий среду с добавлением меди, тестируемый агент и анализ для измерения жизнеспособности клеток.

В некоторых аспектах, в настоящем документе предложен набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий хелатор меди, тестируемый агент и анализ для измерения гибели клеток.

ПРИМЕРЫ

Элескломол представляет собой соединение, разработанное в качестве противоракового терапевтического агента. Компания Synta Pharmaceuticals получила результаты в ходе исследования фазы II, которые показали, что элескломол может обеспечивать улучшение выживаемости без прогрессирования рака в сочетании с паклитакселом (O'Day *et al.*, J Clin Oncol, 2009, полностью включена посредством ссылки). Однако последующее испытание фазы III Synta Pharmaceuticals потерпело неудачу. Апостериорный анализ результатов испытаний фазы III выявил корреляцию между высоким уровнем лактатдегидрогеназы (LDH) и эффективностью элескломол (O'Day *et al.*, J Clin Oncol, 2013, полностью включена посредством ссылки). LDH является ключевым ферментом анаэробного дыхания. Потенциальные причины неудачи исследования фазы III заключались в том, что 1) механизм действия элескломол был неизвестен, 2) отсутствовал биомаркер для отбора пациентов, 3) элескломол применяли в субоптимальном составе.

Недавние результаты, о которых сообщалось в Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019 показывают, что уничтожение элескломол зависит от меди (фигура 1). Кроме того, было

обнаружено, что митохондриальный белок ферредоксин 1 (FDX1) является прямой мишенью элескломола (фигура 4). Полногеномные скрининги спасения CRISPR показали, что делеция FDX1 придает резистентность к двум различным аналогам элескломола (фигура 2). Кроме того, анализ биомаркеров PRISM показал, что высокая экспрессия FDX1 коррелирует с повышенной чувствительностью к элескломолу (фигура 3). Tsvetkov *et al.*, Nat Chem Bio, 2019 продемонстрировали, что элескломол ингибирует активность FDX1 *in vitro*, и элескломол-Cu(II) является нео-субстратом FDX1 (фигура 5 и фигура 6). Авторы продемонстрировали, что повышенный уровень митохондриального метаболизма, присутствующий во многих моделях с лекарственной резистентностью, прогнозирует чувствительность к элескломолу (фигура 7).

Пример 1: FDX1 регулирует путь липоевой кислоты.

Создают клеточные линии CRISPRKO FDX1 или клеточные линии CRISPRKO LIAS, которые оценивают на уровне липоилированных белков липоил-DLAT и липоил-DLST с помощью вестерн-блоттинга (фигура 8). Вестерн-блоттинг показал, что уровни липоилированного белка резко снижаются в линиях клеток CRISPRKO по сравнению с контрольными клетками. Кроме того, обработка клеток 1 мкМ элескломол в течение 6 часов показала, что уровни белков липоил-DLAT и липоил-DLST со временем снижаются. В заключение было обнаружено, что FDX1 регулирует путь липоевой кислоты (фигура 8).

Пример 2. Окрашивание липоевой кислоты является биомаркером чувствительности к элескломолу.

Липоевую кислоту окрашивают в клетках FDX1 KO с помощью иммуногистохимического анализа. Изображения под микроскопом показали, что уровни липоевой кислоты резко снижены в клетках FDX1 KO по сравнению с контрольными клетками (фигура 10). Окрашивание ткани аденокарциномы толстой кишки показало, что уровни липоевой кислоты в ткани повышены. В заключение, окрашивание опухолей на липоевую кислоту может служить биомаркером опухолей с повышенным уровнем митохондриального метаболизма. Кроме того, обнаружено, что повышенный уровень липоевой кислоты в опухолях чувствителен к соединениям, связанным с медью, таким как элескломол и дисульфирам.

Пример 3. Различные соединения способствуют медь-зависимой гибели клеток.

В дополнение к элескломолу, было обнаружено, что другие соединения способствуют медь-зависимой гибели раковых клеток (фигура 9).

Пример 4: Кластеризация профилей жизнеспособности соединений выявляет уникальный кластер соединений, которые способствуют медь-зависимой гибели клеток.

Чтобы выявить новый уникальный путь, таргетирующий лекарственные средства, которые могут способствовать гибели раковых клеток, анализируют кластеризацию профилей жизнеспособности соединений при тестировании 1448 соединений на 489 клеточных линиях. Этот анализ выявил уникальный кластер молекул, связывающих металл (фигура 12). Интересно, что многие из этих соединений специфически связывают медь. Было показано, что соединение дисульфирама против зависимости и аналогичные по

структуре аналоги, такие как тирам и моносulfид тетраметилтиурама (ТМТ), могут способствовать медь-зависимым фенотипам. Оксихинолин (8-HQ), который связывает различные металлы, может способствовать медь-зависимой индукции деградации, опосредованной протеасомами, и пиритион, который способствует медь-зависимой гибели клеток в дрожжах. В частности, интерес представляет соединение элескломол, которое связывает и переносит медь в митохондрии и оказывает как положительное, так и вредное воздействие на клетку. Кластеризация этих молекул, связывающих медь, в уникальный модуль предполагает, что некоторые клетки могут иметь уникальную чувствительность к молекулам, связывающим медь, которая отличается от других исследованных соединений в этой когорте.

Соединения, связывающие металлы, могут индуцировать токсический фенотип либо за счет секвестрации (хелатирования) металлов из жизненно важных факторов, либо за счет перемещения (*например*, ионофора) металлов в клеточные компартменты, где они токсичны. Чтобы определить, способствуют ли соединения, наблюдаемые в кластере, гибели клеток за счет хелатирования или переноса определенных металлов, исследуют клеточную токсичность, вызванную каждым соединением в присутствии или в отсутствие железа, кобальта, меди, никеля и цинка. Во всех исследованных случаях, добавление меди значительно усиливает индукцию гибели клеток всеми соединениями кластера (фигура 13). В меньшей степени, цинк с дисульфидом, NSC319756 или пиритион и железо с 8HQ также способны способствовать гибели клеток. Таким образом, связывание меди и индуцированная медью гибель клеток являются общим фенотипом отдельного кластера соединений.

Пример 5. Индуцированная медью гибель клеток является неапоптотической или ферроптотической.

Элескломол демонстрирует наиболее селективное связывание с медью в кластере (фигура 13). Чувствительность клеток к элескломолу зависит от доступности меди. Добавление меди либо в среду в физиологических концентрациях (1 мкМ), либо в соотношении 1:1 с соединением значительно усиливает гибель клеток, индуцированную элескломолем (фигура 15). Хелатирование меди из среды тетратиомолибдатом (ТТМ) полностью блокирует гибель клеток, индуцированную элескломолем, в моделях множественных клеточных линий (фигура 27). Медь не добавляют в среду (RPMI), и поэтому доступность меди ограничена содержанием меди в сыворотке, которое может сильно варьироваться. Таким образом, клетки, обработанные элескломолем в бессывороточной среде, проявляют повышенную резистентность, которая полностью устраняется добавлением меди в среду (фигура 16). Добавление меди в среду сильно снижает вариабельность эффективности элескломолы, как показано для подмножества клеточных линий рака яичников (фигура 28), позволяя предположить, что внутриклеточные уровни меди могут также определять чувствительность к элескломолу, когда экзогенные уровни меди низкие. Таким образом, эффективность элескломолы зависит от наличия внеклеточной и внутриклеточной меди.

И железо, и медь могут генерировать высокореактивный гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$) из $\text{O}_2\bullet^-$ и H_2O_2 в клетке посредством реакции Фентона. В случае железа, это может дать липидные радикалы, вызывающие ферроптоз, неапоптозную гибель клеток. Предыдущие результаты показали, что элескломол индуцирует ROS-зависимую апоптозную гибель клеток. Однако недавно было показано, что гибель клеток, вызванная элескломолом, не связана со значительной активацией каспазы-3. Таким образом, чтобы определить, является ли вызванная элескломолом гибель клеток апоптотической, предпринимают генетический подход с использованием клеток HCM18, у которых нокаутированы важные эффекторы апоптоза (Bak и Bax) (фигура 29). Как и ожидалось, в клетках с делецией Bak/Bax эффективность индуцирующего апоптоз паклитаксела сильно ингибируется (фигура 11). Однако способность элескломол-меди индуцировать гибель клеток не страдает (фигура 11). Другие молекулы, связывающие медь, тестируют на этих клеточных линиях, и во всех случаях на эффективность этих соединений не влияет генетическое нарушение пути апоптоза (фигура 32).

Чтобы дополнительно установить, какие пути гибели клеток могут быть опосредованы индуцированной элескломолом медь-зависимой гибелью клеток, предпринимают химический подход с использованием соединений, которые блокируют критические ниши известных путей гибели клеток. Предварительная обработка клеток соединениями, которые блокируют апоптоз (ингибиторами панкаспазы), ферроптоз (ферростатином-1), некроптоз (некростатином-1) и другими антиоксидантами и путями, регулирующими гибель клеток, не блокирует гибель клеток, вызванную элескломолом-медью. В качестве контроля используют ингибитор GPX4, индуцирующий ферроптоз (ML162), и ингибитор протеасом, индуцирующий апоптоз (бортезомиб). В трех испытанных клеточных линиях, только хелатирование меди с помощью ТТМ способно блокировать индуцированную элескломолом гибель клеток (фигура 11). Соединения, изменяющие ферроптоз или апоптоз (как показано в контрольных образцах ML162 и бортезомиба), не влияют на гибель клеток, вызванную элескломолом-медью. В соответствии с этими выводами, элескломол-медь не вызывает глубоких изменений в перекисном окислении липидов, которые обычно наблюдаются при индукции ферроптоза. Наблюдаемые небольшие изменения, скорее всего, связаны с хелатирующими свойствами молекулы меди. Элескломол-медь показал повышенную токсичность и снижение уровней перекисного окисления липидов и хелатирования меди под действием ТТМ. В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что элескломол-медь и другие соединения, связывающие медь, вызывают гибель клеток, которая химически и генетически отличается как от апоптоза, так и от ферроптоза. Учитывая абсолютную зависимость и регулирование этого пути гибели клеток медью, этот процесс для простоты называют «купроптозом».

Пример 6. Липоилирование, регулируемое FDX1, является ключевым регулятором чувствительности к элескломолу.

Элескломол-индуцированный купроптоз регулируется митохондриальным

метаболизмом. Клетки, вынужденные перейти на усиленный митохондриальный метаболизм при замене глюкозы галактозой в среде, становятся все более чувствительными к элескломолу (фигура 7 и фигура 30). Этот переход к митохондриальному метаболизму также сильно потенцирует эффективность других молекул, связывающих медь, некоторые из которых проявляют более сильные эффекты, чем другие. В то время как влияние митохондриального метаболизма на 8-HQ, пиритион и TMT довольно слабое, действие дисульфирама и NSC-319726 сходно с таковым, показанным для элескломолу (фигура 32). Чтобы установить, опосредован ли этот эффект цепью переноса электронов (ETC), тестируют клетки 143B rho0 (не содержащие митохондриальную ДНК) и их родительские контроли (143B). Удивительно, но клетки 143B rho0 оказались немного более чувствительными к гибели клеток в случае элескломолу и дисульфирама или такими же чувствительными к гибели клеток в случае TMT, NSC319726, пиритиона и 8HQ под действием соединений, связывающих медь (фигура 31, фигура 32). Это исключило возможность того, что элескломолу и другим соединениям, связывающим медь, требуется функциональный ETC для стимуляции гибели клеток.

Ранее было показано, что ферредоксин 1 (FDX1) является важным медиатором индуцированной элескломолом токсичности. Элескломол напрямую связывается с FDX1, что может снижать количество связанной с элескломолом меди, способствуя купроптозу. Чтобы лучше понять потенциальные нижестоящие медиаторы купроптоза, используют стратегию делеции CRISPR/Cas9. Целевой скрининг сосредоточен на 3000 метаболических ферментов для идентификации генов, которые теряют приобретенную резистентность как к одному элескломолу, так и в комбинации с добавками меди в адгезивной клеточной линии рака легкого A549. Во всех условиях, ген FDX1 является наиболее результативным, что подчеркивает важность этого гена в опосредованной элескломолом токсичности (фигура 33). Интересно, что имеется несколько попаданий по двум различным функциональным путям: митохондриальный комплекс I и путь липоевой кислоты. Путь липоевой кислоты опосредует липоилирование лизина специфических ферментов (DLAT, DLST, DBT, GCSH), что имеет решающее значение для их функции (фигура 34). Интересно, что как липоилирующие ферменты (LIAS), так и последующие липоилированные ферменты-мишени (комплекс PDH) являются хитами при скрининге генетических модификаторов. Это убедительно свидетельствует о том, что липоилированное состояние клетки играет роль в опосредовании индуцированной элескломолом токсичности. Эта гипотеза является особенно привлекательной, поскольку липоилирование необходимо для митохондриального дыхания, и было показано, что липоевая кислота имеет высокое сродство к связыванию с медью. Выводы подтверждены и показали, что делеция FDX1 действительно придает резистентность к элескломолу-Cu(II), а также к дисульфираму-Cu(II) на множественных клеточных моделях (фигура 18). Делеции фермента липоилирования LIAS также достаточно для повышения резистентности к элескломолу (фигура 18).

Пример 7: FDX1 является вышестоящим регулятором липоилирования.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные FDX1, естественная функция FDX1 в клетке все еще обсуждается. С одной стороны, было показано, что FDX1 участвует в митохондриальном кластерном пути Fe-S. А с другой стороны, есть доказательства, которые противоречат этим выводам, предполагая, что FDX1 играет другую роль. Чтобы определить роль FDX1 в раковых клетках, проводят анализ, чтобы определить, какие гены демонстрируют аналогичный эффект жизнеспособности при отключении CRISPR/Cas9 в сотнях линий раковых клеток. Этот анализ показал, что делеция FDX1 сильно коррелирует с белками двух функциональных категорий, митохондриальным комплексом I и путем липоевой кислоты (фигура 19). Эти результаты почти идентичны функциональным совпадениям при восстановлении генетической делеции с использованием элескломола (фигура 33). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что гены пути FDX1 и липоевой кислоты находятся в одном и том же функциональном пути.

Чтобы установить, находится ли FDX1 выше пути липоилирования белка, FDX1 и другие важные ферменты пути липоилирования (LIPT1, LIAS, LIPT2) нокаутируют. Липоилированное состояние DLAT и DLST оценивают с использованием антитела, которое распознает липоилированный лизин. Делеция FDX1, как и делеция установленных ферментов пути LA, полностью устраняет уровни липоилированных DLAT и DLST, что наблюдается как с помощью вестерн-блоттинга, так и с помощью ИHC (фигура 20 и фигура 21).

Согласно оценке, многие метаболиты изменяют в клетках FDX1 KO по сравнению как с контролем, таргетирующим AAVS1, так и с родительскими клетками K562, что согласуется с недавно обнаруженной ролью FDX1 в регуляции липоилирования белка (фигура 35). В частности, происходит накопление пирувата и α -KG при истощении сукцината, что ожидается при угнетении активности DLAT и DLST (фигура 22). Также наблюдается сильное увеличение соотношения NAD/NADH без существенных изменений уровня лактата. Интересно, что также наблюдается накопление общих уровней SAM, что позволяет предположить, что SAM, потребляемый липоилированием белка в этих клетках, составляет значительную часть общего клеточного SAM. В совокупности, данные метаболомики убедительно подтверждают выводы о том, что FDX1 является вышестоящим регулятором липоилирования белков.

Линии клеток, которые в предыдущем эксперименте PRISM показали либо чувствительность, либо резистентность, выбирают для дальнейшего определения действия элескломола на клетку (фигура 23). Эти клетки в среднем имеют более высокую экспрессию мРНК FDX1 (фигура 26), и можно воспроизвести общую разницу в чувствительности (фигура 26). Чувствительные клетки в целом показывают более высокие уровни экспрессии белка FDX1 и липоилированного белка (фигура 27). Липоевая кислота является сильным связующим для меди, поэтому вполне вероятно, что медь, связанная с элескломолем, может непосредственно воздействовать на липоилированные белки. Действительно, добавление элескломола в таких низких концентрациях, как 10 нМ, снижает уровни липоилированных

белков без значительного влияния на уровни белков (фигура 36 и фигура 37).

Пример 8: Жизнеспособность клеток после увеличения доз лекарственных средств, связывающих медь

Жизнеспособность клеток MON измеряют после обработки увеличивающимися дозами указанных препаратов в присутствии 10 мкМ FeCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, NiCl, CuCl₂ или CoCl₂ (фигура 13). Жизнеспособность клеток NCIN2030 измеряют после обработки возрастающими дозами указанных препаратов в присутствии 10 мкМ FeCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, NiCl, CuCl₂ или CoCl₂ (фигура 14).

Пример 9: Скрининг положительной селекции CRIPSR/Cas9 в клетках A549

Экспериментальная установка скрининга положительной селекции CRIPSR/Cas9 в клетках A549 показана на фигуре 17. В скрининге используют библиотеку, таргетирующую 3000 генов, связанных с метаболизмом (~10 нРНК на ген). Наиболее положительно обогащенные онРНК в клетках, обработанных 40 нМ элескломола-Cu(II) скрининга, показаны в таблице 4.

Таблица 4

Имя гена	Функция	Количество онРНК
sgFDX1	Кластер Fe-S	10
sgDLAT	PDH-липоевая кислота	7
sgNDUFB6	Комплекс I	6
sgNDUFC2	Комплекс I	4
sgNDUFA6	Комплекс I	4
sgNDUFS1	Комплекс I	4
sgISCA2	Кластер Fe-S	3
sgLIAS	Липоевая кислота	3
sgPDHB	PDH	3
sgNDUFS8	Комплекс I	3
sgNDUFA2	Комплекс I	3
sgNDUFS3	Комплекс I	3
sgNDUFA9	Комплекс I	3
sgNDUFV1	Комплекс I	3
sgNDUFS2	Комплекс I	3
sgNDUFB8	Комплекс I	3
sgNDUFV2	Комплекс I	3
sgNDUFB11	Комплекс I	3
sgCNGA2	Другая	3
sgPLOD1	Другая	3

sgST6GAL2	Другая	3
sgABCA13	Другая	3

Гены сортируют по функциональности: кластерный путь Fe-S, путь липоевой кислоты, комплекс I и другие.

Было обнаружено, что делеция FDX1 в клетках A549 придает относительную резистентность к элескломолу-Cu(II) и дисульфираму-Cu(II). Было обнаружено, что делеция LIAS и FDX1 в клетках OVISe придает резистентность к элескломолу-Cu(II) (фигура 18).

На основании результатов скрининга, корреляционный анализ показал, что делеция FDX1 коррелирует с делецией компонентов двух различных путей, пути липоевой кислоты и комплекса I (фигура 19).

Было обнаружено, что удаление FDX1 приводит к элиминации клеточных липоилированных белков как в клетках OVISe, так и в клетках K562 (фигура 20 и фигура 21).

В заключение, модель функции FDX1 в липоевой кислоте показана на фигура 22.

Пример 10: анализ PRISM

Распределение жизнеспособности 724 клеточных линий исследуют с помощью анализа PRISM. Было обнаружено, что уровни экспрессии мРНК FDX1 повышены в чувствительных клеточных линиях по сравнению с контролем (фигура 23). Уровни экспрессии FDX1 подтверждены на фигуре 24.

Вестерн-блоттинг показал, что резистентные клетки демонстрируют повышенные уровни белка FDX1 и более низкие уровни липоилированных белков, чем чувствительные клетки (фигура 25). Уровни липоилирования снижаются после обработки клеток A549 1 мкМ элескломолу (+CuCl₂) (фигура 26).

Пример 11: Анализ изменения копии гена

Анализ изменения копий гена проводят с помощью платформы набора данных Cancer Genome Atlas (TCGA) для биомаркеров, связанных с повышенными уровнями митохондриального метаболизма. Результаты показали, что экспрессия FDX1 сильно коррелирует с изменением числа копий (CN) хромосомы 11 (фигура 38).

Пример 12: Создание модели ксенотрансплантата мыши с положительным биомаркером

Положительные по биомаркерам клетки чувствительны к обработке элескломолу-Cu(II), что соответствует измеренным концентрациям и кинетике, измеренной в исследованиях фармакокинетики (ФК) на мышах.

Вымывание клеточной культуры:

Исследование имитирует короткое время воздействия, которое имитирует фармакокинетические (ФК) свойства элескломолу-Cu(II).

Полученные результаты:

2-часовое воздействие при 200 нМ с последующим вымыванием, достаточным для селективного уничтожения клеток биомаркеров. Результаты показаны на фигуре 48.

Данные поддерживают профиль активности, управляемый $C_{\max}$. Клетки используют для создания модели ксенотрансплантата SubQ, в которой можно анализировать эффективность различных ионофоров меди.

Эквиваленты

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования роста или пролиферации опухоли и/или иммунных клеток, включающий:

(а) определение того, имеет ли опухоль и/или иммунная клетка уровень липоилирования белка выше порогового уровня; и

б) если уровень липоилирования белка выше порогового уровня, контакт опухоли и/или иммунной клетки с ионофором меди.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ионофор меди вызывает гибель опухолевых клеток и/или гибель иммунных клеток.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что липоилированный белок представляет собой липоил-DLAT (липоил-дигидролипоацетилтрансферазу), липоил-DLST (липоил-дигидролипоилсукцинилтрансферазу), липоил-GCSH (белок H системы расщепления липоил-глицин) или липоил-DBT (трансацилазу E2 липоил-дигидролипоамида с разветвленной цепью).

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что определение того, характеризуется ли опухоль и/или иммунная клетка уровнем липоилирования белка выше порогового уровня, включает измерение уровня липоилирования белка в клетках опухоли и/или иммунной клетке.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий определение того, характеризуется ли опухоль и/или иммунная клетка уровнем митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, выше порогового уровня.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что определение того, характеризуется ли опухоль и/или иммунная клетка уровнем митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, выше порогового уровня, включает измерение уровня митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, в клетках опухоли и/или иммунной клетке.

7. Способ по п.5 или 6, отличающийся тем, что митохондриальный белок связывает ионофор меди.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дитиокарбамат.

9. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой пиритион цинка.

10. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой тетраметилтиураммоносульфид.

11. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой оксихинолин (8HQ).

12. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой тирам.

13. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди

представляет собой Cu(GTSM).

14. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой NSC-319726.

15. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой FR-122047.

16. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой Cu(isapn).

17. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе Paullone.

18. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе казиопеина.

19. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс бис(тиосемикарбазон)Cu.

20. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе Изатина-Шиффа.

21. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс (D-глюкопираноза)-4-фенилтиосемикарбазид Cu.

22. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой BCANa₂.

23. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой BCSNa₂.

24. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофором меди является BCANa₂.

25. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой РТА.

26. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой DAPТА.

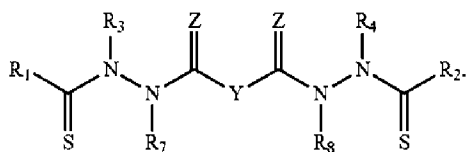
27. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой растворимый комплекс тиосемикарбазона.

28. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс оснований Шиффа.

29. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дитиокарбамат.

30. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой бис(тиогидразидамид).

31. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение Формулы А или его соль:



где:

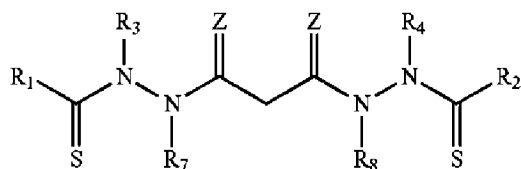
Y представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную углеводородную группу с прямой цепью, или Y, вместе с обеими группами $>C=Z$, с которыми он связан, представляет собой необязательно замещенную ароматическую группу;

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

32. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы B1 или его соль:



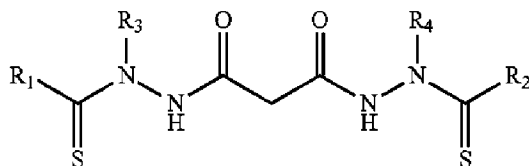
где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

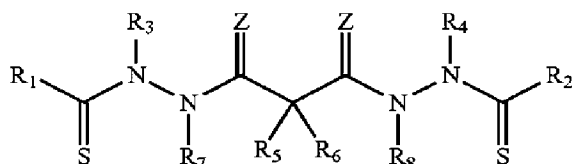
33. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы B2 или его соль:



где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 взятые вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно слитое с ароматическим кольцом.

34. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы С или его соль:



где:

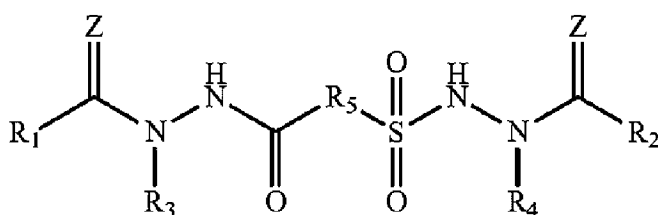
R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_5 и R_6 независимо представляют собой -H или низший алкил;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

35. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы D или его соль:



где:

каждый Z независимо представляет собой S, O или Se, при условии, что оба Z не могут быть O;

R_1 и R_2 каждый независимо выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила; необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного циклоалкенила, необязательно замещенной гетероциклической группы, в которой гетероциклическая группа связана с углеродом тиокарбонила через углерод-углеродную связь, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического

арила, необязательно замещенного пяти-семи-членного моноциклического гетероарила, необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, в котором гетероарильная группа связана с углеродом тиокарбонила через связь углерод-углерод, $-NR_{12}R_{13}$, $-OR_{14}$, $-SR_{14}$ и $-S(O)_pR_{15}$;

R_3 и R_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила, необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного циклоалкенила, необязательно замещенной гетероциклической группы и необязательно замещенной пяти-шести-членной арильной или гетероарильной группы; или

R_1 и R_3 и/или R_2 и R_4 вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенную гетероциклическую группу или необязательно замещенную гетероарильную группу;

R_5 представляет собой $-CR_6R_7$ -, $-C(=CHR_8)$ - или $-C(=NR_8)$ -;

R_6 и R_7 оба представляют собой $-H$ или необязательно замещенный низший алкил;

R_8 выбран из группы, состоящей из $-OH$, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галоалкила, галоалкенила, галоалкинила, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-шести-членного моноциклического гетероарила, необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, необязательно замещенного циклоалкила или необязательно замещенного гетероцикла; $-NR_{10}R_{11}$ и $-COR_9$;

R_9 представляет собой необязательно замещенный фенил, необязательно замещенный бициклический арил, необязательно замещенный пяти- или шести-членный моноциклический гетероарил, необязательно замещенный девяти-четырнадцати-членный бициклический гетероарил, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный циклоалкил или необязательно замещенный гетероцикл;

R_{10} и R_{11} каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из $-H$, $-OH$, amino, (ди)алкиламино, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галогеналкила, галогеналкенила, галогеналкинила, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-шестичленного моноциклического гетероарила, необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, необязательно замещенного циклоалкила или необязательно замещенной гетероциклической группы и $-COR_9$, или R_{10} и R_{11} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют пяти-шести-членную гетероарильную группу; и

R_{12} , R_{13} и R_{14} каждый независимо представляет собой $-H$, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный фенил или необязательно замещенный бензил, или R_{12} и R_{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенную гетероциклическую группу или необязательно замещенную гетероарильную

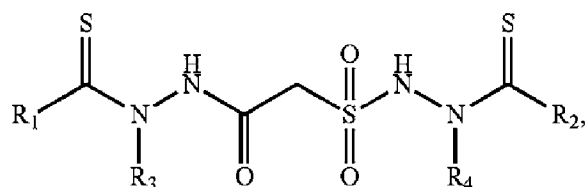
группу;

R_{14} представляет собой optionally замещенный алкил, optionally замещенный арил или optionally замещенный гетероарил, и

p равно 1 или 2;

при условии, что когда оба Z являются S и R_3 и R_4 оба являются метилом, тогда R_1 и R_2 оба не являются незамещенными фенилами.

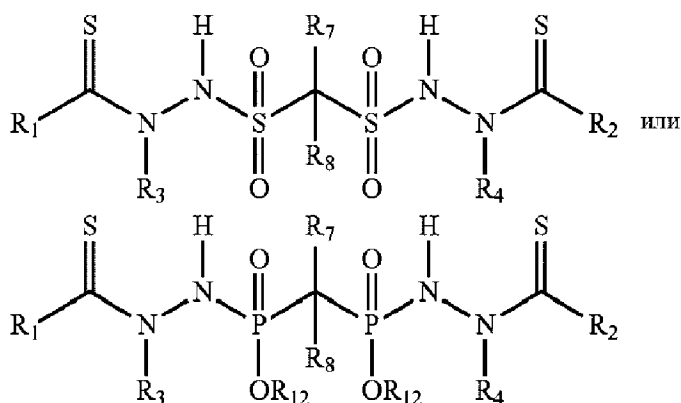
36. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы E или его соль:



где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, optionally замещенную алифатическую группу, optionally замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, optionally конденсированное с ароматическим кольцом;

37. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение следующей формулы или его соль:



где:

R_1 и R_2 независимо представляют собой optionally замещенный алкил, optionally замещенный алкенил, optionally замещенный алкинил, optionally замещенный циклоалкил, optionally замещенный циклоалкенил, optionally замещенный гетероциклический, optionally замещенный арил, optionally замещенный гетероарил, галоген, нитро, циано, гуанидино, $-OR_{17}$, $-NR_{19}R_{20}$, $-C(O)R_{17}$, $-C(O)OR_{17}$, $-OC(O)R_{17}$, $-C(O)NR_{19}R_{20}$, $-NR_{18}C(O)R_{17}$, $-OP(O)(OR_{17})_2$, $-SP(O)(OR_{17})_2$, $-SR_{17}$, $-S(O)_pR_{17}$, $-OS(O)_pR_{17}$, $-S(O)_pOR_{17}$, $-NR_{18}S(O)_pR_{17}$ или $-S(O)_pNR_{19}R_{20}$;

R_3 и R_4 независимо представляют собой -H, optionally замещенный алкил,

необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

R₇ и R₈ каждый независимо представляет собой -H или необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный гетероциклил или R₇ представляет собой H и R₈ представляет собой необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и R₁, R₂, R₃; и

R₁₂ независимо представляет собой -H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил или галоген.

38 Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой ингибитор ALDH.

39. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой элескломол.

40. Способ по любому из пп. 5-7 или 39, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой FDX1 (ферредоксин 1).

41. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дисульфирам.

42. Способ по любому из пп. 1-7 или 10, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой ALDHA1 (альдегиддегидрогеназу A1) или ALDH2 (альдегиддегидрогеназу 2).

43. Способ по п.5 или 6, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой белок, участвующий в биосинтезе липоевой кислоты.

44. Способ по пп. 5, 6 или 43, отличающийся тем, что белок, участвующий в биосинтезе липоевой кислоты, представляет собой LIAS (синтетазу липоевой кислоты), LIPT1 (липоилтрансферазу 1) или LIPT2 (липоилтрансферазу 2) или DLD (дигидролипоамиддегидрогеназу).

45. Способ по любому из пп. 1-44, отличающийся тем, что контакт опухоли и/или иммунной клетки с ионофором меди ингибирует комплекс пируватдегидрогеназы, комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекс дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью и/или расщепление глицина.

46. Способ по любому из пп. 1-45, дополнительно включающий обработку опухоли и/или иммунной клетки другим противораковым агентом совместно с ионофором меди.

47. Способ по п.46, в котором ионофор меди усиливает действие противоракового агента по сравнению с только одним противораковым агентом.

48. Способ по п.46 или 47, отличающийся тем, что противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент, ингибитор иммунной контрольной точки, ингибитор EGFR или ингибитор протеасом.

49. Способ по п.48, отличающийся тем, что противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент.

50. Способ по п.49, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин.

51. Способ по п.49, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой ингибитор b-raf.

52. Способ по п.49, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой доцетаксел.

53. Способ по п.49, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой иматиниб.

54. Способ по п.48, отличающийся тем, что противораковый агент представляет собой ингибитор EGFR.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

56. Способ по п.54, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой gefитиниб.

57. Способ по п.54, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой осимертиниб.

58. Способ по любому из пп. 46-27, отличающийся тем, что ионофор меди усиливает гибель опухолевых клеток и/или гибель иммунных клеток противоракового агента по сравнению с одним противораковым агентом.

59. Способ по любому из пп. 1-58, отличающийся тем, что ионофор меди предварительно загружают медью (II).

60. Способ по п.59, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой элескломол.

61. Способ по п.59, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дисульфирам.

62. Способ лечения рака, резистентного к лечению противораковым агентом, у субъекта, включающий стадии:

(а) определение того, характеризуется ли рак уровнем липоилирования белка выше порогового уровня; и

(b) если рак характеризуется уровнем липоилирования белка выше порогового уровня, совместное введение субъекту ионофора меди и противоракового агента.

63. Способ по п.62, отличающийся тем, что противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент, ингибитор иммунной контрольной точки, ингибитор EGFR или ингибитор протеасом.

64. Способ по п.63, отличающийся тем, что противораковый агент представляет

собой химиотерапевтический агент.

65. Способ по п.64, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин.

66. Способ по п.64, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой ингибитор b-raf.

67. Способ по п.64, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой доцетаксел.

68. Способ по п.64, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой иматиниб.

69. Способ по п.63, отличающийся тем, что противораковый агент представляет собой ингибитор EGFR.

70. Способ по п.69, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

71. Способ по п.69, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой gefитиниб.

72. Способ по п.69, отличающийся тем, что ингибитор EGFR представляет собой осимертиниб.

73. Способ по любому из пп. 62-72, отличающийся тем, что липоилированный белок представляет собой липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH или липоил-DBT.

74. Способ по любому из пп. 62-73, отличающийся тем, что определение того, характеризуется ли рак уровнем липоилирования белка выше порогового уровня, включает измерение уровня липоилирования белка в раковых клетках.

75. Способ по любому из пп. 62-74, дополнительно включающий определение того, характеризуется ли рак уровнем митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, выше порогового уровня.

76. Способ по любому из пп. 75, отличающийся тем, что определение того, характеризуется ли рак уровнем митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, выше порогового уровня, включает измерение уровня митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок в раковых клетках.

77. Способ по п.42 или 43, отличающийся тем, что ионофор меди связывается с митохондриальным белком.

78. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дитиокарбамат.

79. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой пиритион цинка.

80. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой тетраметилтиурама моносульфид.

81. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой оксихинолин (8HQ).

82. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой тирам.

83. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой Cu(GTSM).

84. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой NSC-319726.

85. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой FR-122047.

86. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой Cu(isapn).

87. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе Paullone.

88. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе казиопеина.

89. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс бис(тиосемикарбазона) Cu.

90. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс на основе Изатина-Шиффа.

91. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс (D-глюкопираноза)-4-фенилтиосемикарбазид Cu.

92. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой $BCANa_2$.

93. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой $BCSNa_2$.

94. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой $BCSANA_2$.

95. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой РТА.

96. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой DAPТА.

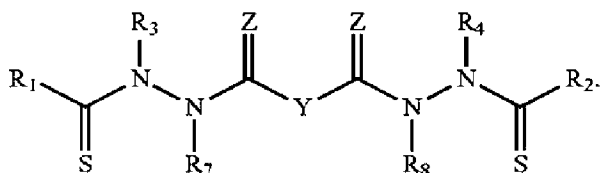
97. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой растворимый комплекс тиосемикарбазона.

98. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой комплекс оснований Шиффа.

99. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дитиокарбамат.

100. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой бис(тиогидразидамид).

101. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы А или его соль:



в которой:

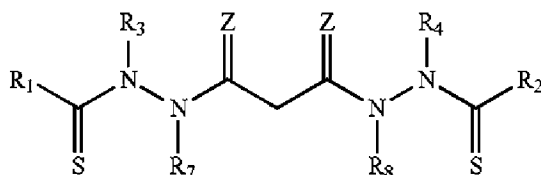
Y представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную углеводородную группу с прямой цепью, или Y, вместе с обеими группами $>C=Z$, с которыми он связан, представляет собой необязательно замещенную ароматическую группу;

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

102. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы B1 или его соль:



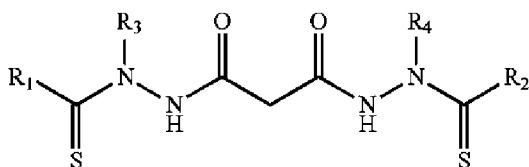
где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

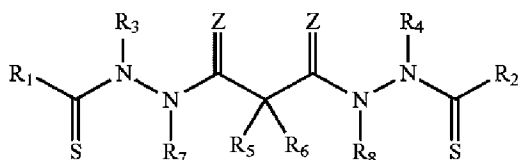
103. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы B2 или его соль:



где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 взятые вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно слитое с ароматическим кольцом.

104. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы С или его соль:



где:

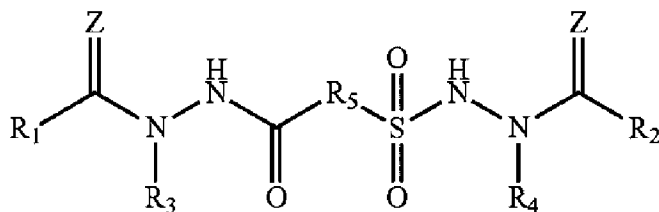
R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу, необязательно замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, необязательно конденсированное с ароматическим кольцом;

R_5 и R_6 независимо представляют собой -H или низший алкил;

R_7 и R_8 независимо представляют собой -H, необязательно замещенную алифатическую группу или необязательно замещенную арильную группу; и

Z представляет собой O или S.

105. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы D или его соль:



где:

каждый Z независимо представляет собой S, O или Se, при условии, что оба Z не могут быть O;

R_1 и R_2 каждый независимо выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила; необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного циклоалкенила, необязательно замещенной гетероциклической группы, в которой гетероциклическая группа связана с углеродом тиокарбонила через углерод-углеродную связь, необязательно замещенного фенила, необязательно замещенного бициклического арила, необязательно замещенного пяти-семи-членного моноциклического гетероарила,

необязательно замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, в котором гетероарильная группа связана с углеродом тиокарбонила через связь углерод-углерод, $-NR_{12}R_{13}$, $-OR_{14}$, $-SR_{14}$ и $-S(O)_pR_{15}$;

R_3 и R_4 каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, optionally замещенного алкила, optionally замещенного алкенила, optionally замещенного алкинила, optionally замещенного циклоалкила, optionally замещенного циклоалкенила, optionally замещенной гетероциклической группы и optionally замещенной пяти-шести-членной арильной или гетероарильной группы; или

R_1 и R_3 и/или R_2 и R_4 вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют optionally замещенную гетероциклическую группу или optionally замещенную гетероарильную группу;

R_5 представляет собой $-CR_6R_7-$, $-C(=CHR_8)-$ или $-C(=NR_8)-$;

R_6 и R_7 оба представляют собой $-H$ или optionally замещенный низший алкил;

R_8 выбран из группы, состоящей из $-OH$, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галоалкила, галоалкенила, галоалкинила, optionally замещенного фенила, optionally замещенного бициклического арила, optionally замещенного пяти-шести-членного моноциклического гетероарила, optionally замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, optionally замещенного циклоалкила или optionally замещенного гетероцикла; $-NR_{10}R_{11}$ и $-COR_9$;

R_9 представляет собой optionally замещенный фенил, optionally замещенный бициклический арил, optionally замещенный пяти- или шести-членный моноциклический гетероарил, optionally замещенный девяти-четырнадцати-членный бициклический гетероарил, optionally замещенный алкил, optionally замещенный циклоалкил или optionally замещенный гетероцикл;

R_{10} и R_{11} каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из $-H$, $-OH$, amino, (ди)алкиламино, алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкенокси, алкиноксила, гидроксиалкила, гидроксиалкенила, гидроксиалкинила, галогеналкила, галогеналкенила, галогеналкинила, optionally замещенного фенила, optionally замещенного бициклического арила, optionally замещенного пяти-шестичленного моноциклического гетероарила, optionally замещенного девяти-четырнадцати-членного бициклического гетероарила, optionally замещенного циклоалкила или optionally замещенной гетероциклической группы и $-COR_9$, или R_{10} и R_{11} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют пяти-шести-членную гетероарильную группу; и

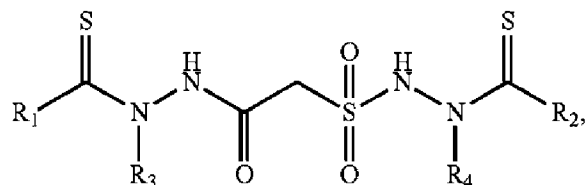
R_{12} , R_{13} и R_{14} каждый независимо представляет собой $-H$, optionally замещенный алкил, optionally замещенный фенил или optionally замещенный бензил, или R_{12} и R_{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют optionally замещенную гетероциклическую группу или optionally замещенную гетероарильную группу;

R_{14} представляет собой optionally замещенный алкил, optionally замещенный арил или optionally замещенный гетероарил, и

p равно 1 или 2;

при условии, что когда оба Z являются S и R_3 и R_4 оба являются метилом, тогда R_1 и R_2 оба не являются незамещенными фенилами.

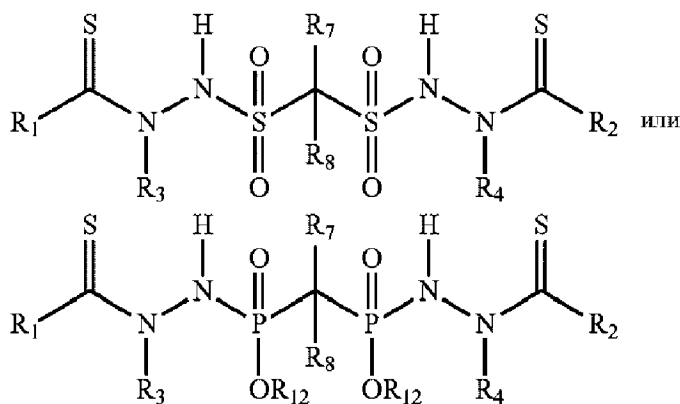
106. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение формулы E или его соль:



где:

R_1 - R_4 независимо представляют собой -H, optionally замещенную алифатическую группу, optionally замещенную арильную группу или R_1 и R_3 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, и/или R_2 и R_4 вместе с атомами углерода и азота, с которыми они связаны, образуют неароматическое кольцо, optionally конденсированное с ароматическим кольцом;

107. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой соединение следующей формулы или его соль:



где:

R_1 и R_2 независимо представляют собой optionally замещенный алкил, optionally замещенный алкенил, optionally замещенный алкинил, optionally замещенный циклоалкил, optionally замещенный циклоалкенил, optionally замещенный гетероцикл, optionally замещенный арил, optionally замещенный гетероарил, галоген, нитро, циано, гуанидино, $-OR_{17}$, $-NR_{19}R_{20}$, $-C(O)R_{17}$, $-C(O)OR_{17}$, $-OC(O)R_{17}$, $-C(O)NR_{19}R_{20}$, $-NR_{18}C(O)R_{17}$, $-OP(O)(OR_{17})_2$, $-SP(O)(OR_{17})_2$, $-SR_{17}$, $-S(O)_pR_{17}$, $-OS(O)_pR_{17}$, $-S(O)_pOR_{17}$, $-NR_{18}S(O)_pR_{17}$ или $-S(O)_pNR_{19}R_{20}$;

R_3 и R_4 независимо представляют собой -H, optionally замещенный алкил, optionally замещенный алкенил, optionally замещенный алкинил, optionally замещенный циклоалкил, optionally замещенный циклоалкенил, optionally замещенный

замещенный гетероцикл, обязательно замещенный арил или обязательно замещенный гетероарил;

R_7 и R_8 каждый независимо представляет собой -H или обязательно замещенный алкил, обязательно замещенный алкенил, обязательно замещенный алкинил, обязательно замещенный циклоалкил, обязательно замещенный циклоалкенил, обязательно замещенный гетероцикл или R_7 представляет собой H и R_8 представляет собой обязательно замещенный арил или обязательно замещенный гетероарил; и R_1 , R_2 , R_3 ; и

R_{12} независимо представляет собой -H, обязательно замещенный алкил, обязательно замещенный алкенил, обязательно замещенный алкинил, обязательно замещенный циклоалкил, обязательно замещенный циклоалкенил, обязательно замещенный гетероцикл, обязательно замещенный арил, обязательно замещенный гетероарил или галоген.

108. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой ингибитор ALDH.

109. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой элескломол.

110. Способ по любому из пп. 75-77 или 109, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой FDX1.

111. Способ по любому из пп. 62-77, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дисульфирам.

112. Способ по любому из пп. 75-77 или 111, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой ALDH1 или ALDH2.

113. Способ по п.75 или 76, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой белок, участвующий в биосинтезе липоевой кислоты.

114. Способ по пп. 75, 76 или 113, отличающийся тем, что белок, участвующий в биосинтезе липоевой кислоты, представляет собой LIAS, LIPT1, LIPT2 или DLD.

115. Способ по любому из пп. 62-114, отличающийся тем, что контакт опухоли и/или иммунной клетки с ионофором меди ингибирует комплекс пируватдегидрогеназы, комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекс дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью и/или расщепление глицина.

116. Способ по любому из пп. 62-115, отличающийся тем, что ионофор меди предварительно загружают медью (II).

117. Способ по п.116, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой элескломол.

118. Способ по п.116, отличающийся тем, что ионофор меди представляет собой дисульфирам.

119. Способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий следующие стадии:

(а) контакт образца клеток с тестируемым агентом;

(b) измерение уровня липоилирования клеточного белка в образце клеток; и

(c) идентификация тестируемого агента как противоракового агента-кандидата, если уровень липоилирования клеточного белка снижен по сравнению с уровнем липоилирования клеточного белка образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом.

120. Способ по п.119, отличающийся тем, что уровень липоилирования клеточного белка в образце клеток, не контактировавшем с тестируемым агентом, представляет собой уровень липоилирования клеточного белка в образце клеток до контакта с тестируемым агентом.

121. Способ по п. 119 или 120, отличающийся тем, что уровень липоилирования клеточного белка образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, представляет собой уровень липоилирования клеточного белка соответствующего контрольного образца клеток.

122. Способ по любому из пп. 119-121, отличающийся тем, что уровень липоилирования клеточного белка образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом, представляет собой уровень липоилирования клеточного белка одного или нескольких эталонных образцов, представляющих собой образец клеток, контактировавший с тестируемым агентом.

123. Способ по любому из пп. 119-122, где липоилированный белок представляет собой липоил-DLAT, липоил-DLST, липоил-GCSH или липоил-DBT.

124. Способ по любому из пп. 119-123, дополнительно включающий измерение уровня или активности митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, в образце клетки и определение того, соответствует ли уровень или активность митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок, снижена по сравнению с уровнем или активностью митохондриального белка и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей митохондриальный белок образца клеток, не контактировавшего с тестируемым агентом.

125. Способ по п. 124, отличающийся тем, что митохондриальный белок представляет собой комплекс FDX1, ALDH1, ALDH2, LIAS, LIPT1, LIPT2, DLD или пируватдегидрогеназы, комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы, комплекс дегидрогеназы альфа-кетокислоты с разветвленной цепью и/или расщепление глицина.

126. Способ по любому из пп. 119-125, дополнительно включающий измерение уровня гибели клеток в образце клеток и определение того, повышается ли уровень гибели клеток по сравнению с уровнем гибели клеток в образце клеток, не контактировавшем с тестируемым агентом.

127. Способ определения повышенного митохондриального метаболизма в опухоли и/или иммунной клетке, включающий окрашивание на липоевую кислоту в опухоли и/или иммунной клетке.

128. Способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии:

- (a) инкубирование образца клеток со средой с добавлением меди;
- (b) контакт образца клеток с тестируемым агентом;
- (c) измерение жизнеспособности клеток в образце клеток; и
- (d) идентификация тестируемого агента в качестве кандидата противоракового агента, если уровень жизнеспособности клеток снижен по сравнению с уровнем жизнеспособности клеток образца клеток, инкубированного со средой с добавлением меди и не контактировавшего с тестируемым агентом.

129. Способ идентификации противоракового агента-кандидата, включающий стадии:

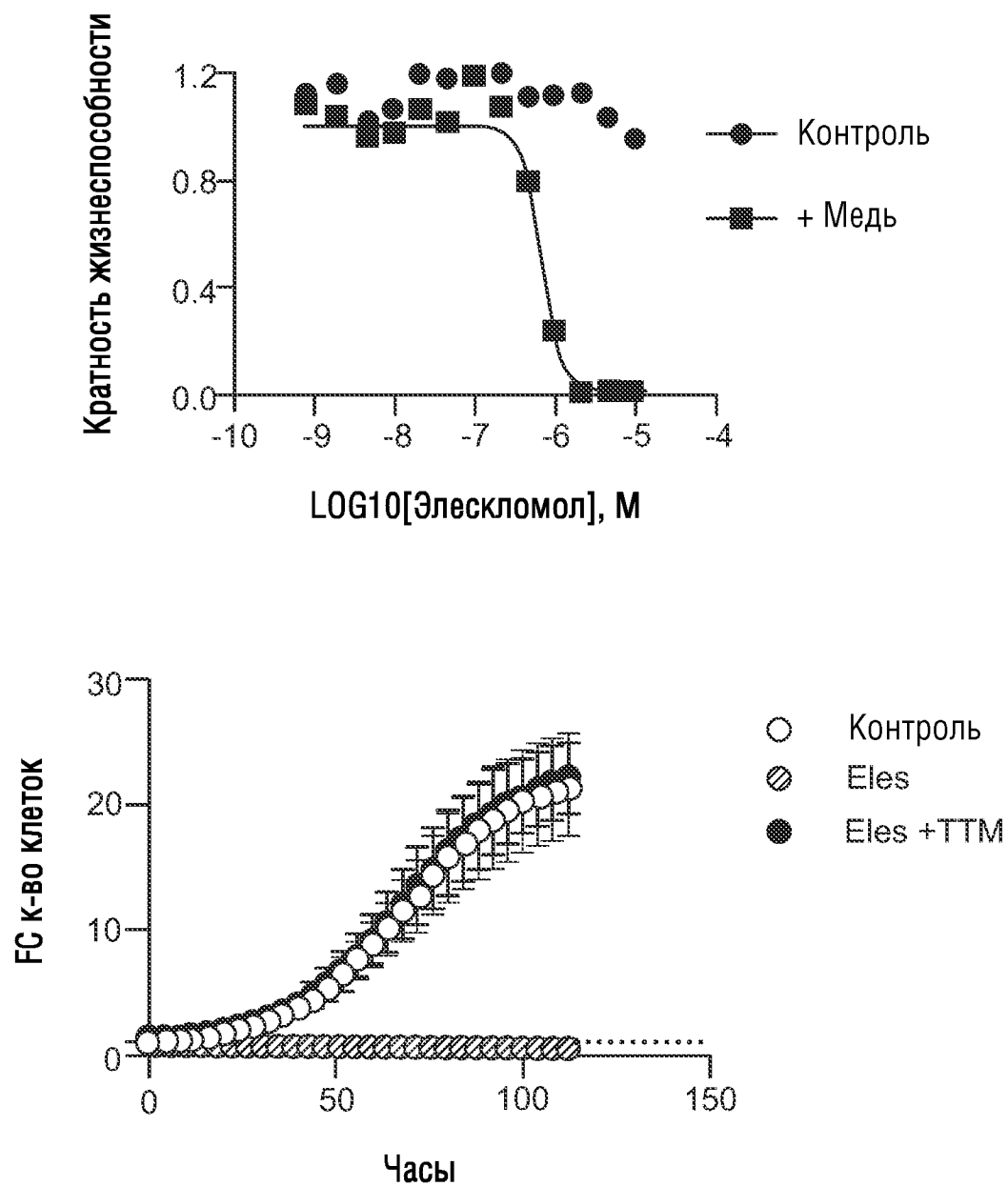
- (a) инкубирование образца клеток с хелатором меди;
- (b) контакт образца клеток с тестируемым агентом;
- (c) измерение гибели клеток в образце клеток; и
- (d) идентификация тестируемого агента в качестве противоракового агента-кандидата, если уровень гибели клеток снижен по сравнению с уровнем гибели клеток образца клеток, инкубированного с хелатором меди и не контактировавшего с тестируемым агентом.

130. Набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий тестируемый агент и анализ для измерения липоилирования клеточного белка.

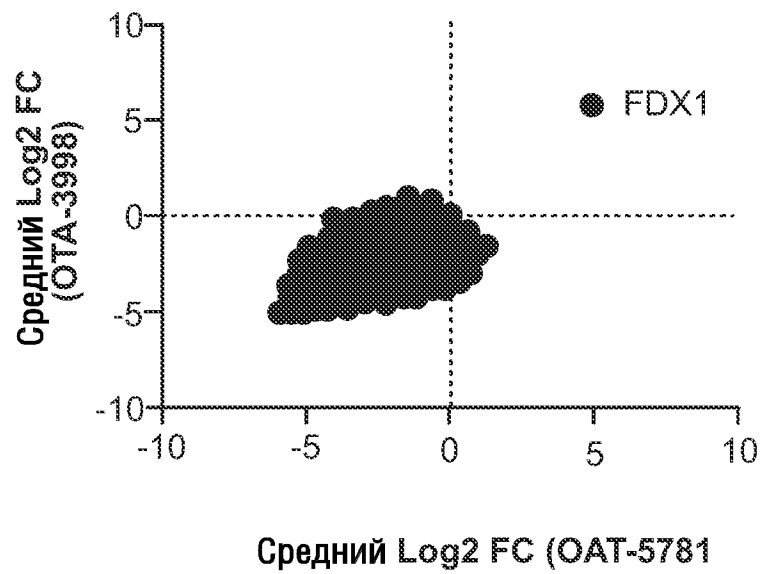
131. Набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий среду с добавлением меди, тестируемый агент и анализ для измерения жизнеспособности клеток.

132. Набор для идентификации противоракового агента-кандидата, включающий хелатор меди, тестируемый агент и анализ для измерения гибели клеток.

ФИГ.1

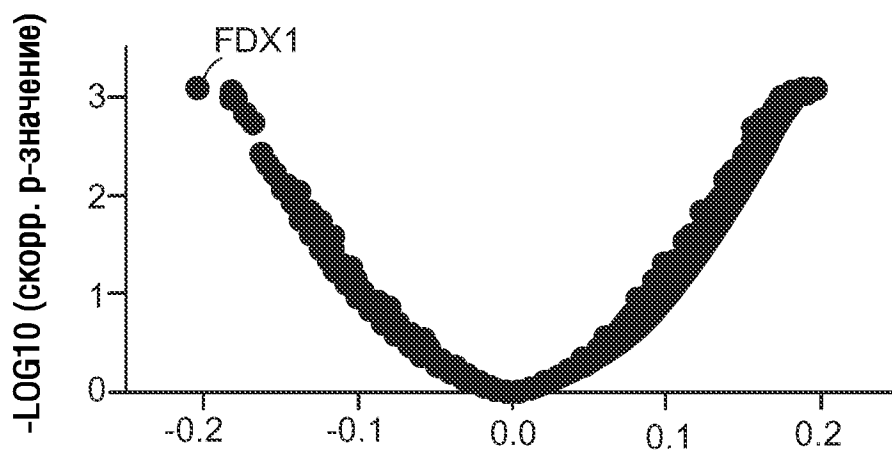


ФИГ.2



ФИГ.3

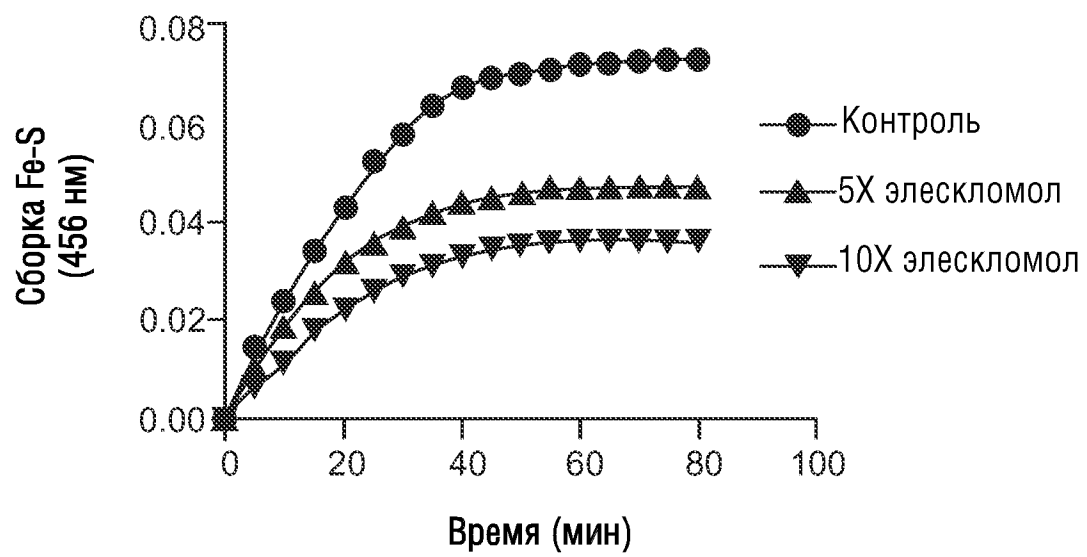
Элескломол AUC к экспрессии генов
n=724 клеточные линии



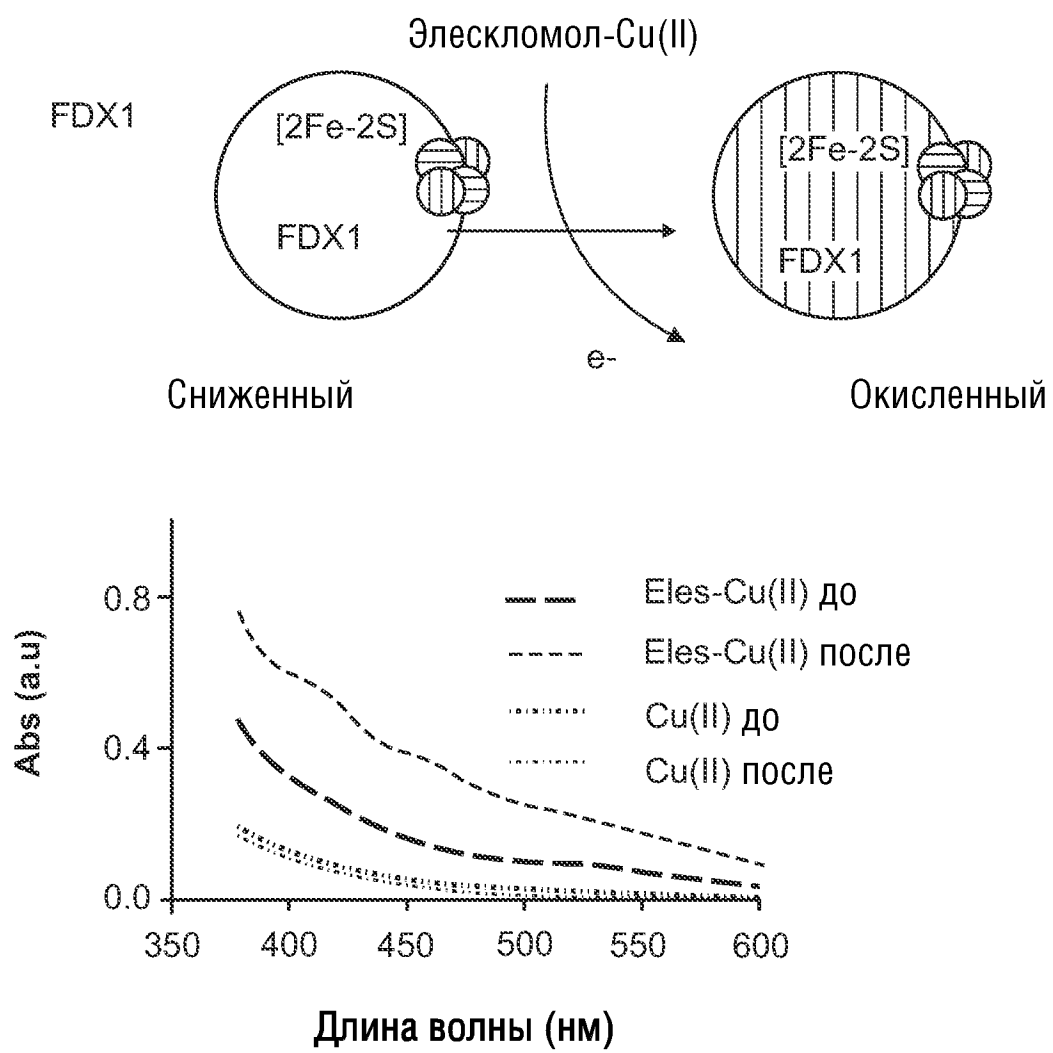
ФИГ.4



ФИГ.5

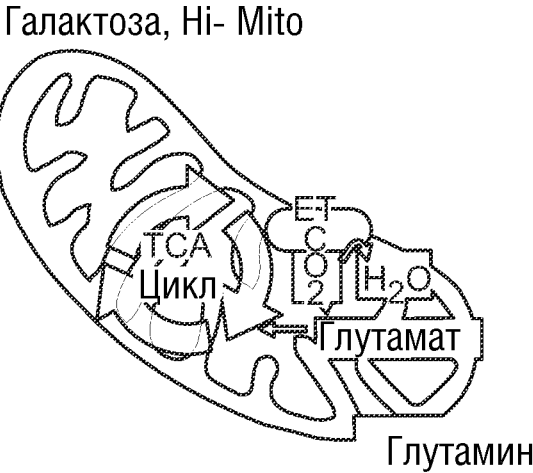
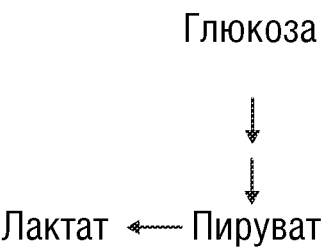


ФИГ.6

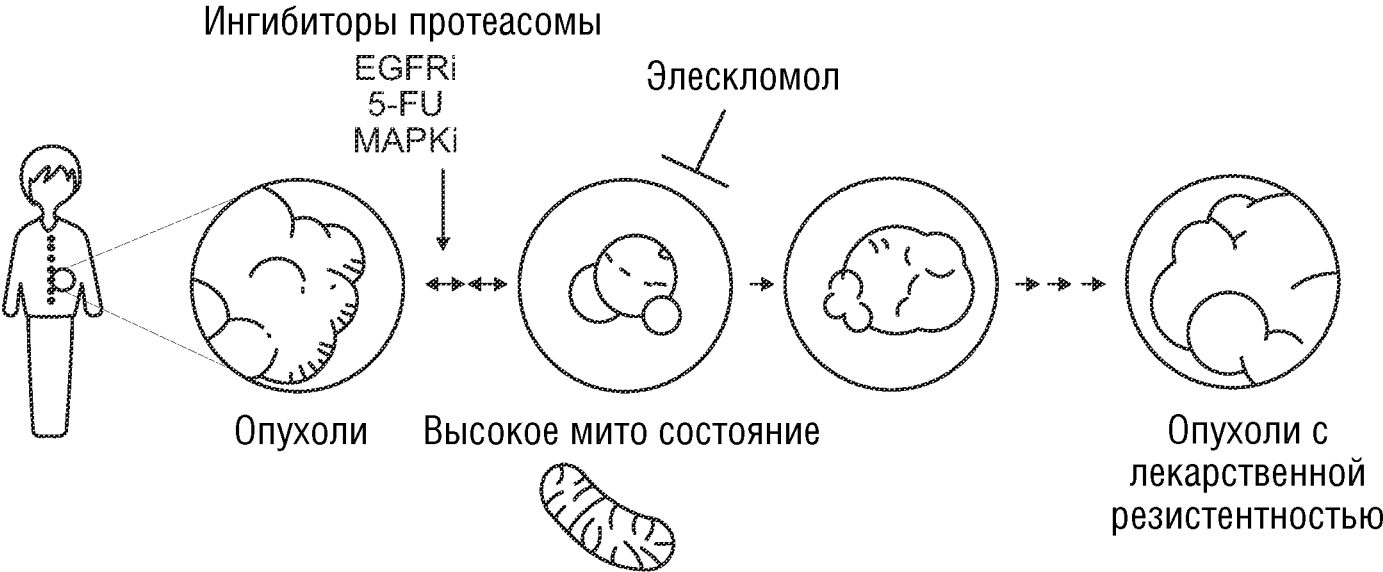


ФИГ.7

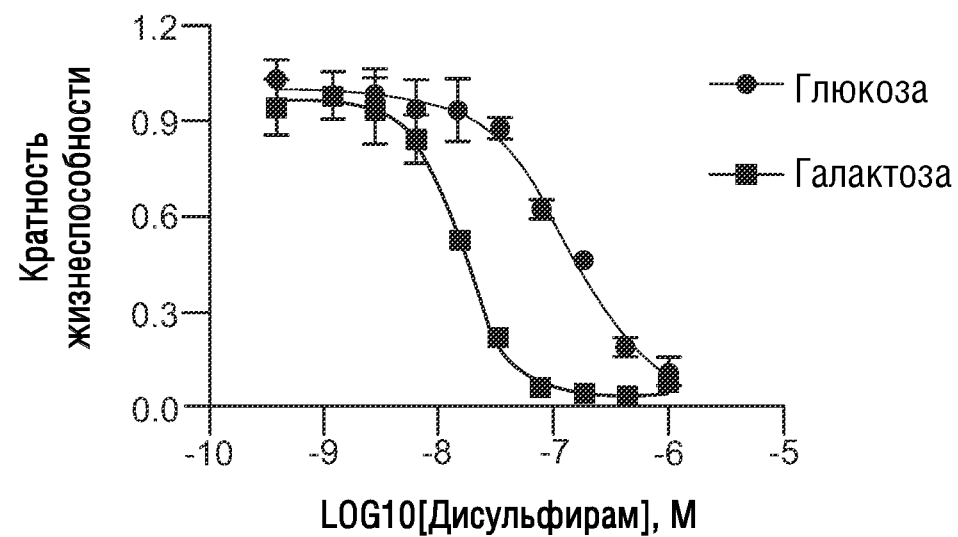
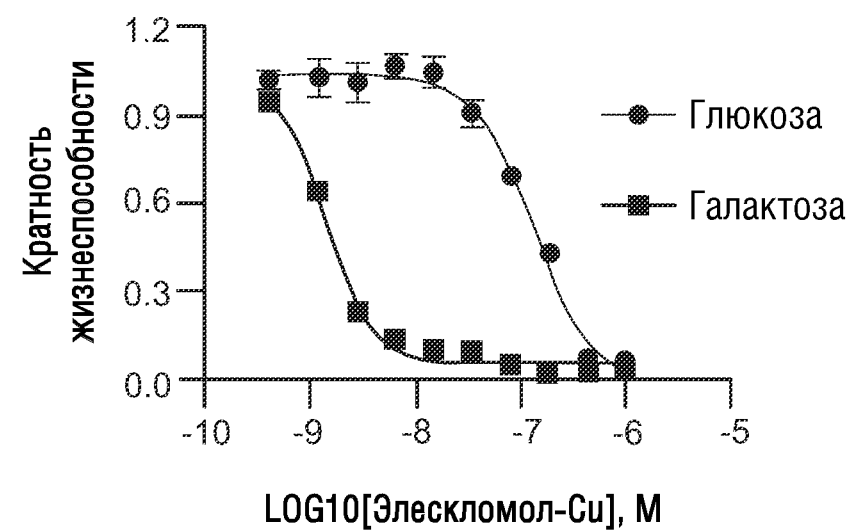
Глюкоза - гликолиз



Высокое митохондриальное состояние во многих моделях лекарственной резистентности

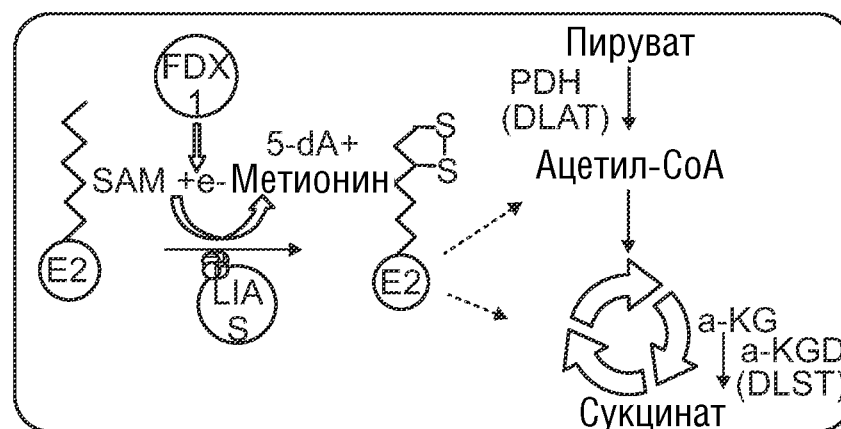


ФИГ.7, продолжение



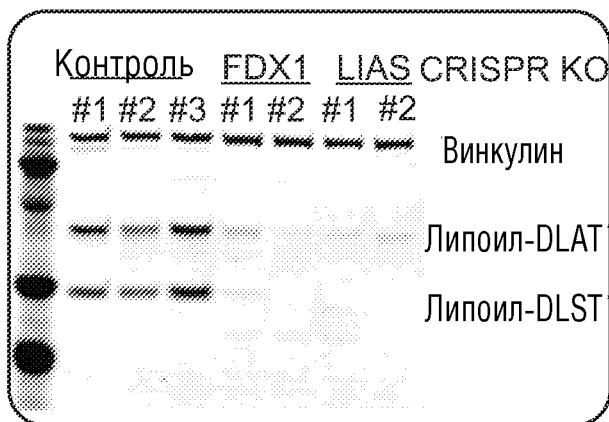
ФИГ.8

FDX1 регулирует путь липоевой кислоты в клетках

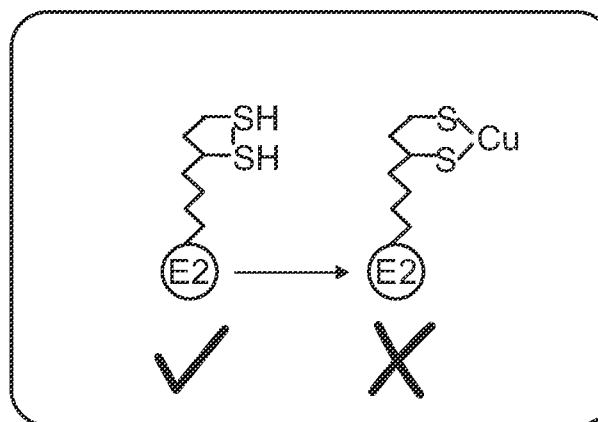


7/49

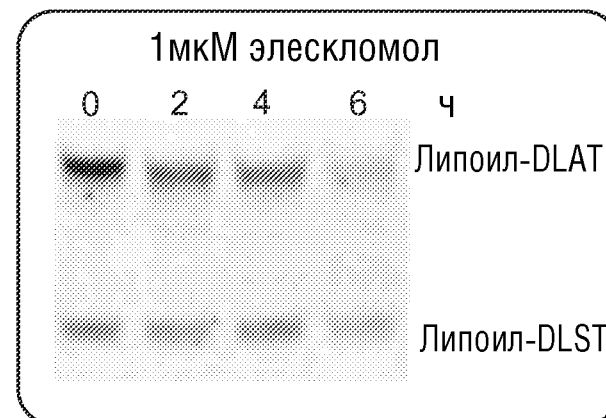
LA путь, регулируемый FDX1



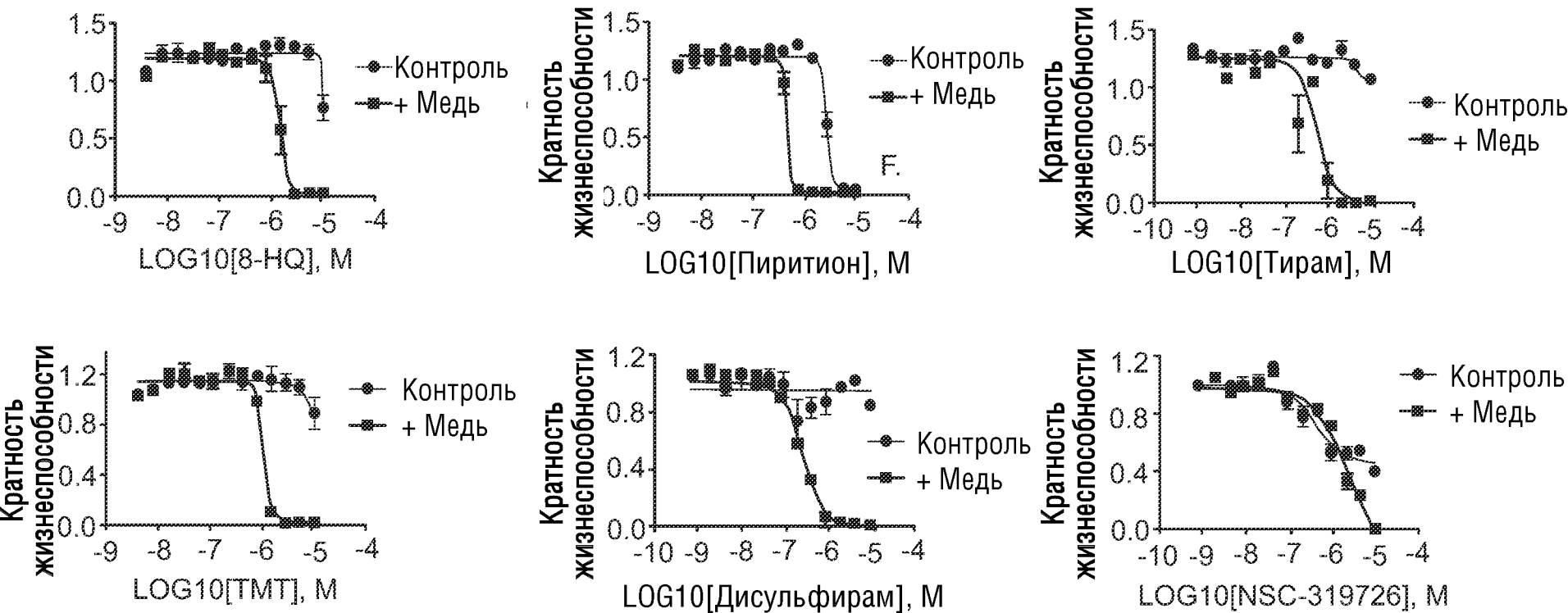
LA связывает медь



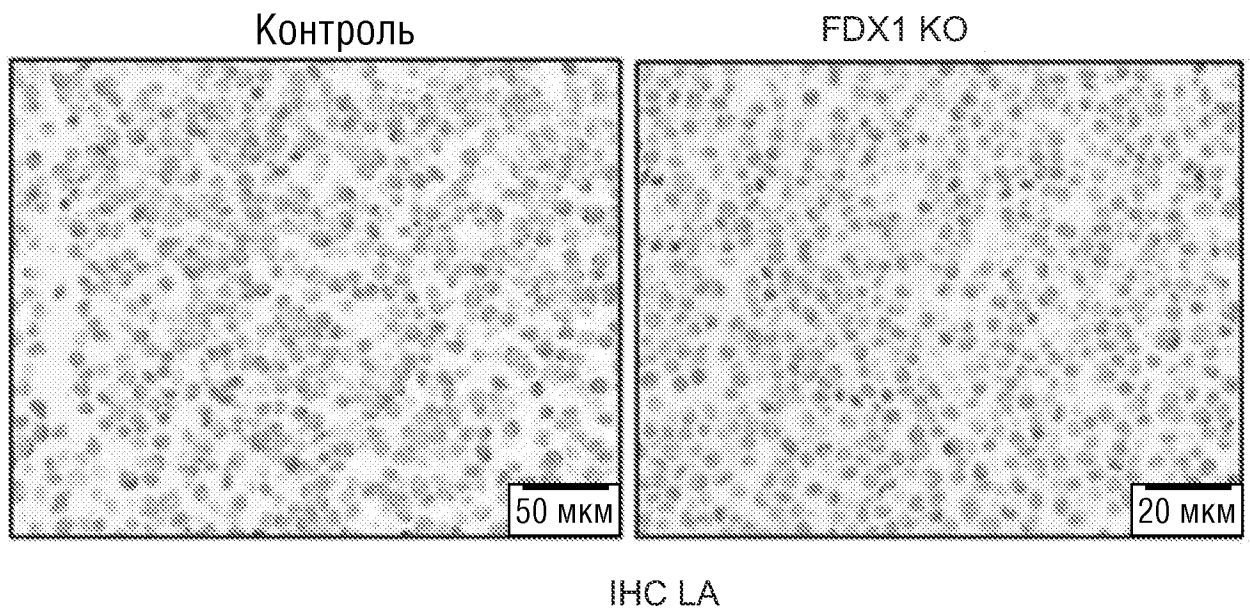
Элескломол снижает клеточный LA



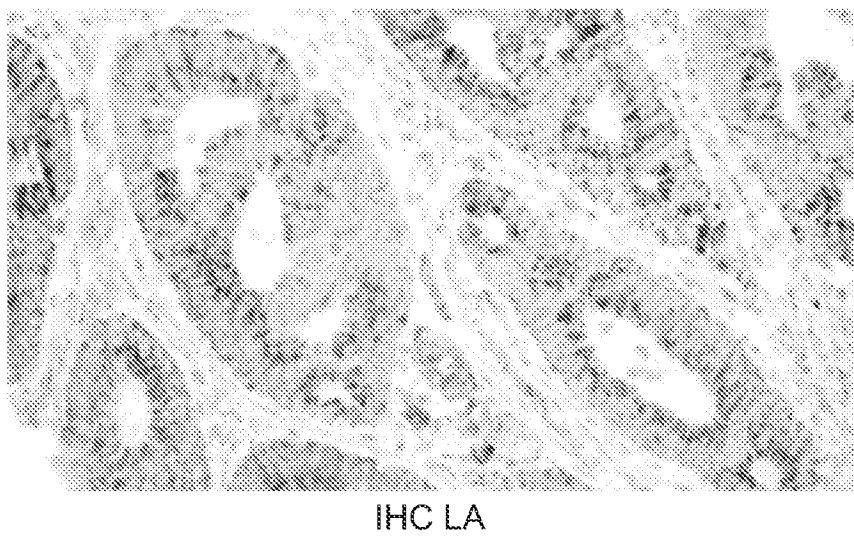
ФИГ.9



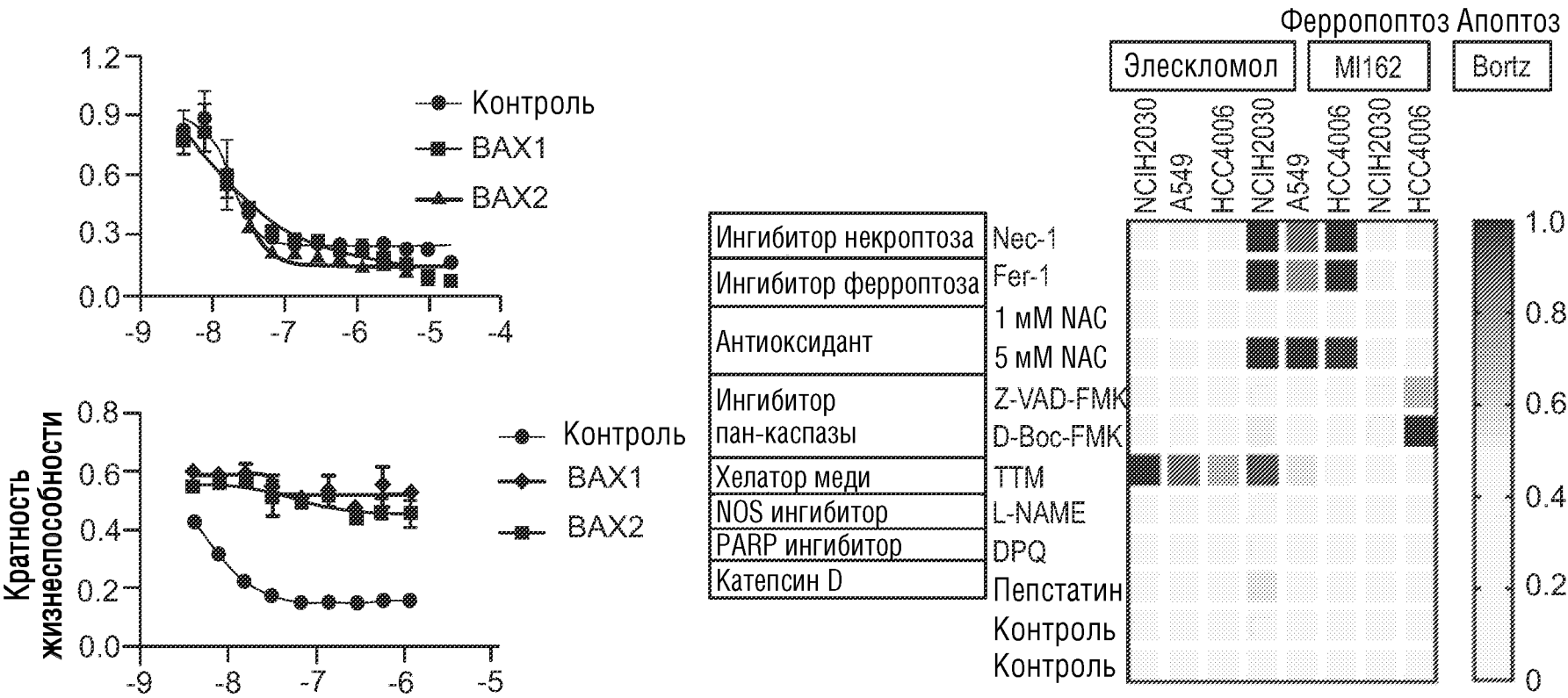
ФИГ.10



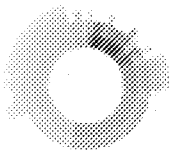
Аденокарцинома прямой кишки



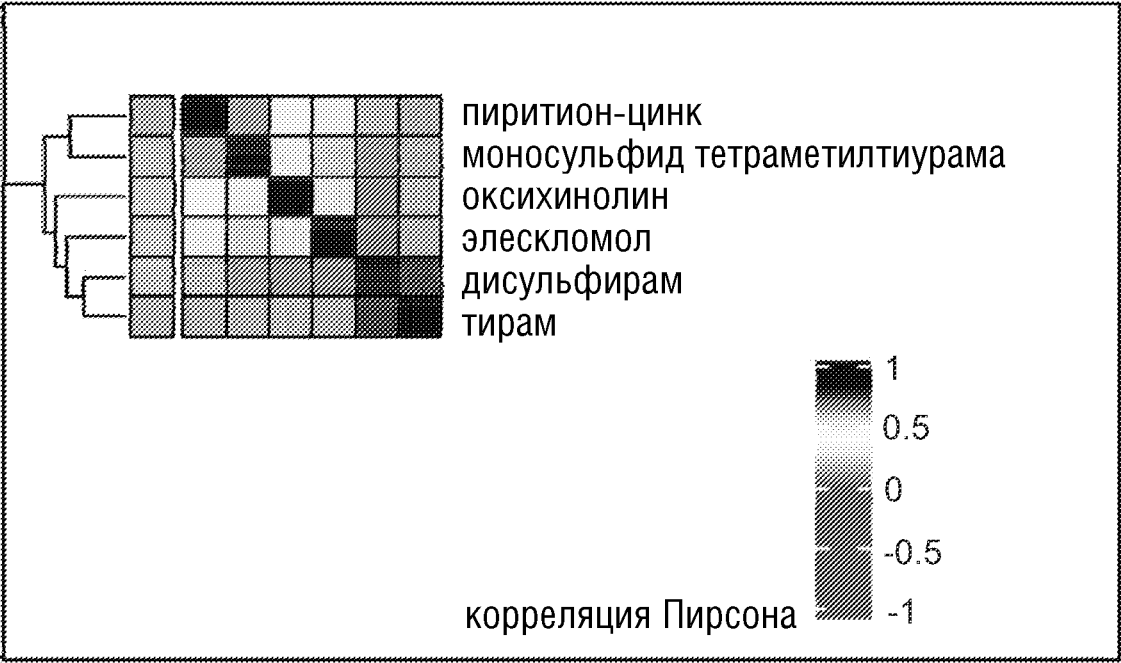
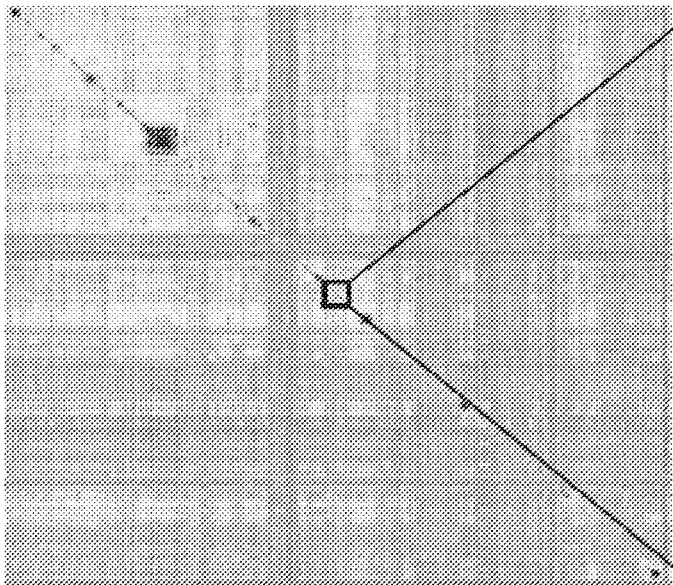
ФИГ.11



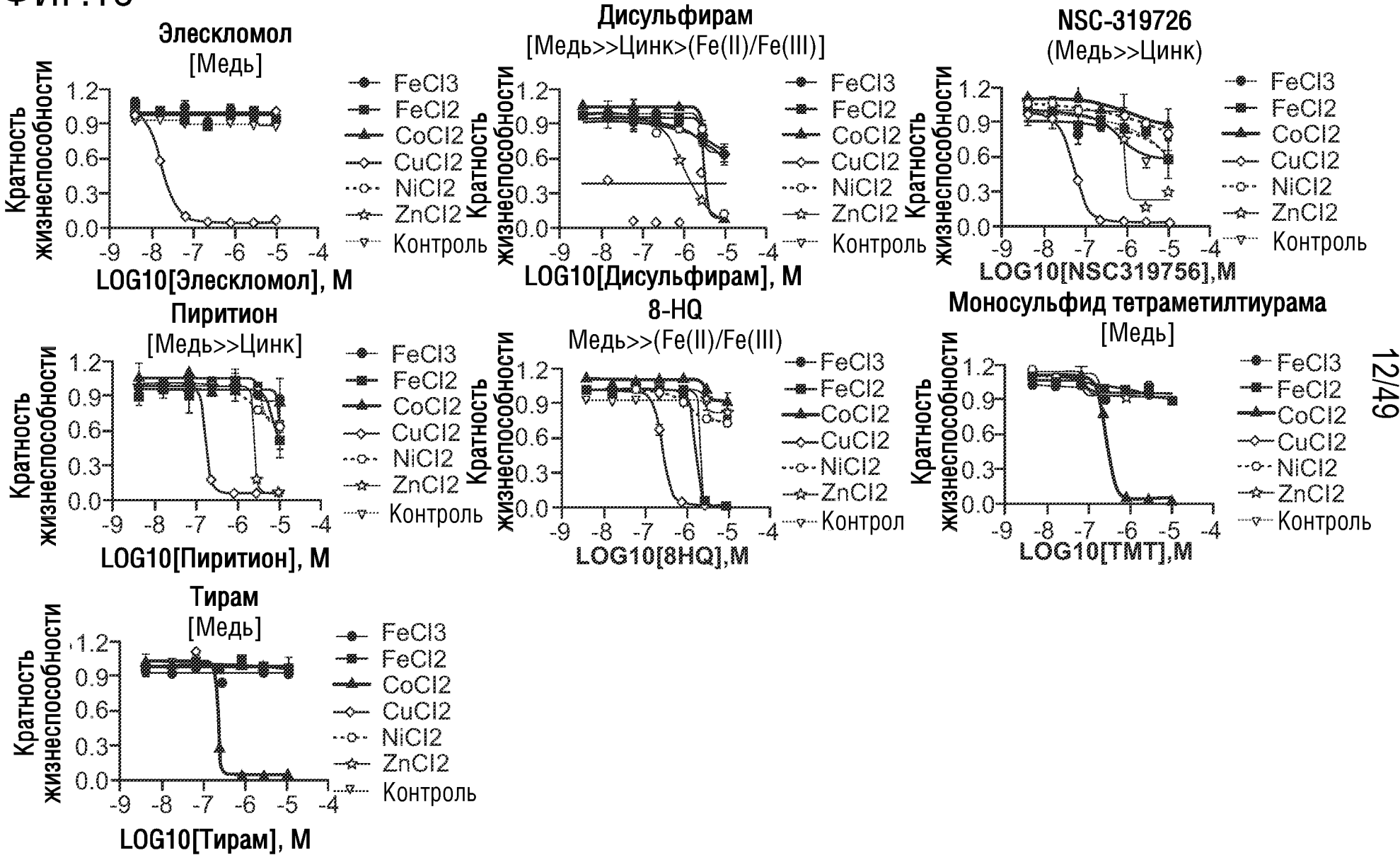
ФИГ.12



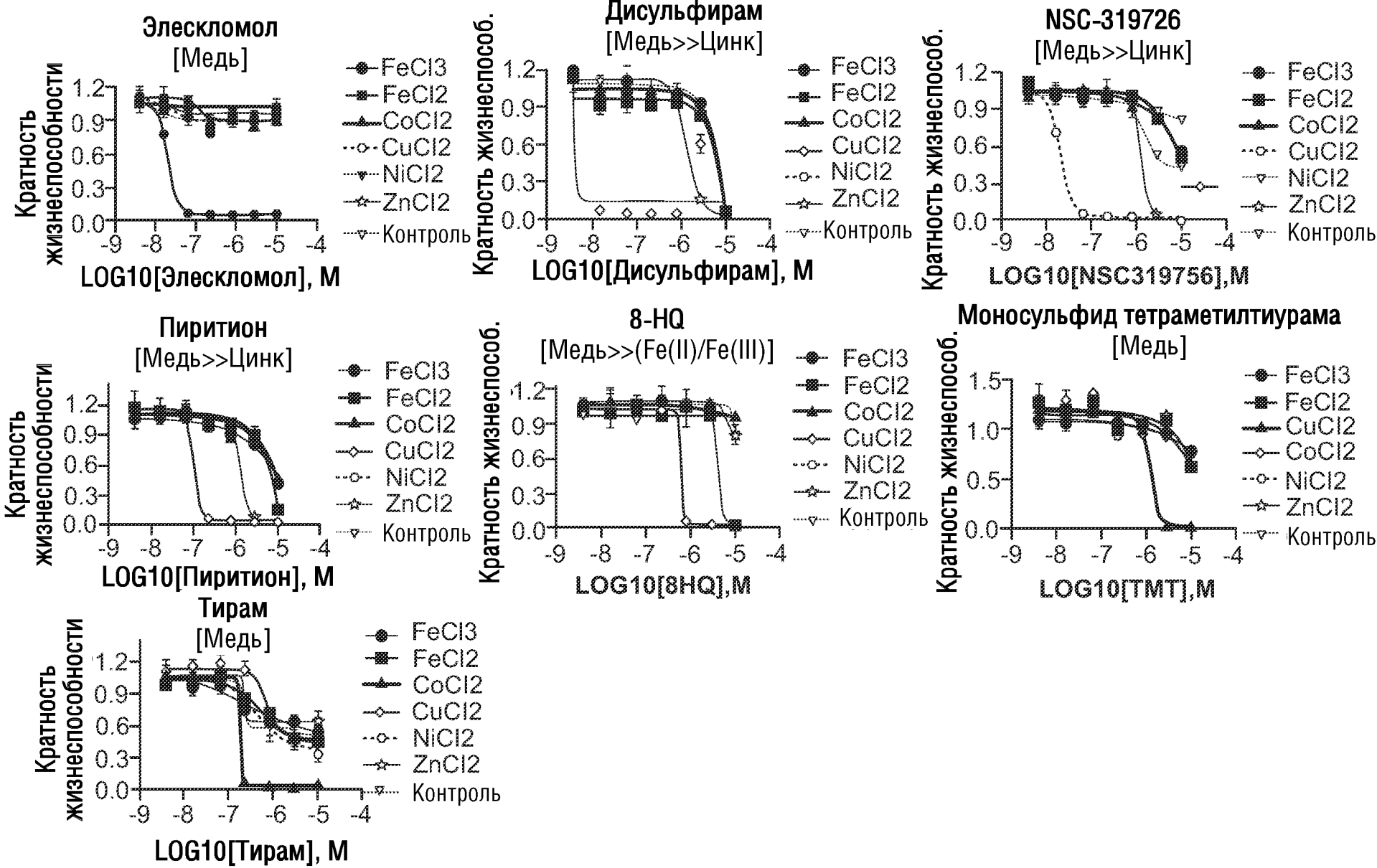
1448 соединений
489 клеточных линий



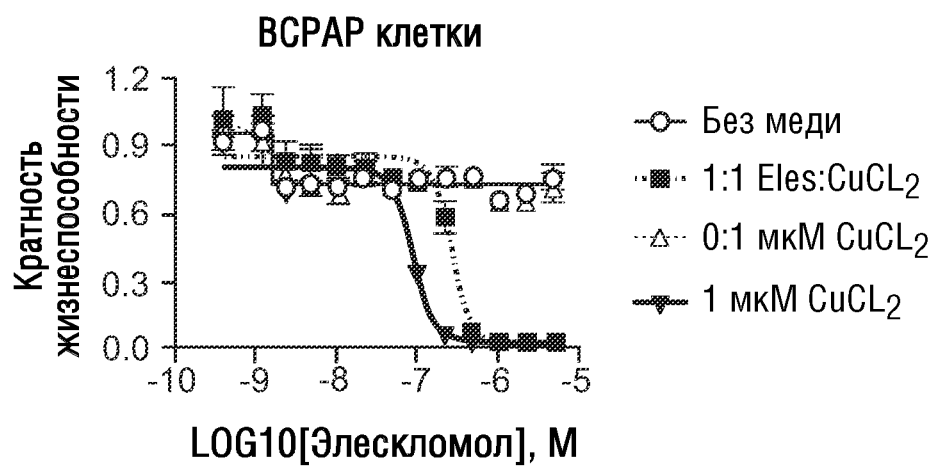
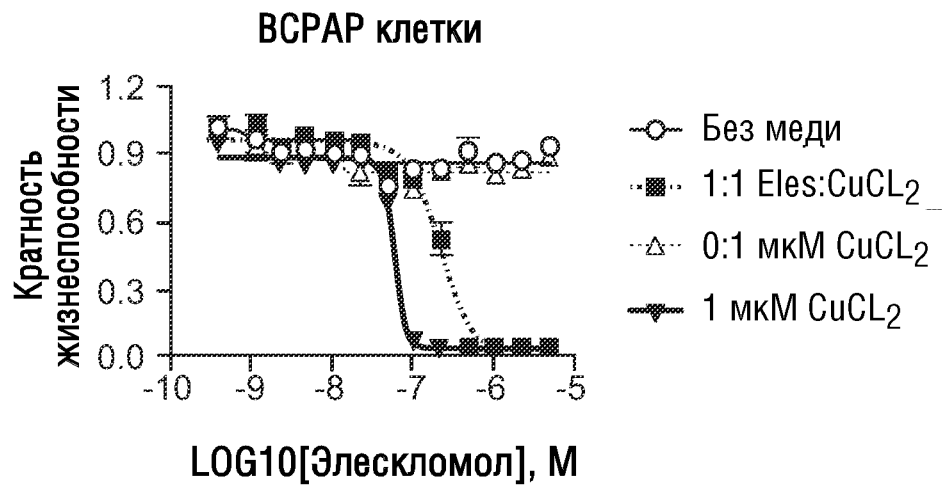
ФИГ.13



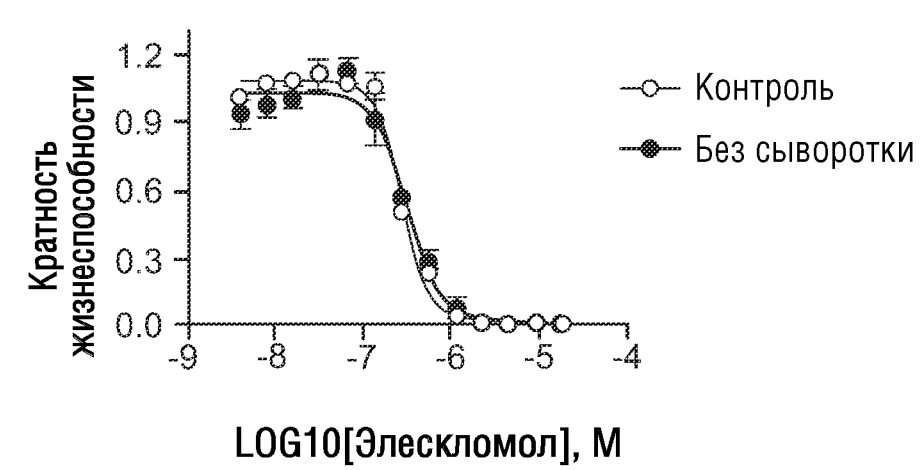
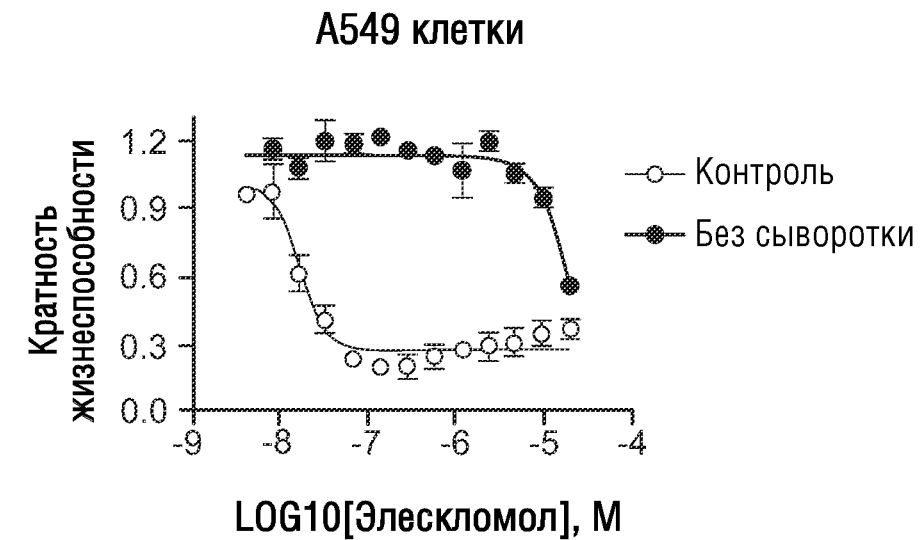
ФИГ.14



ФИГ.15



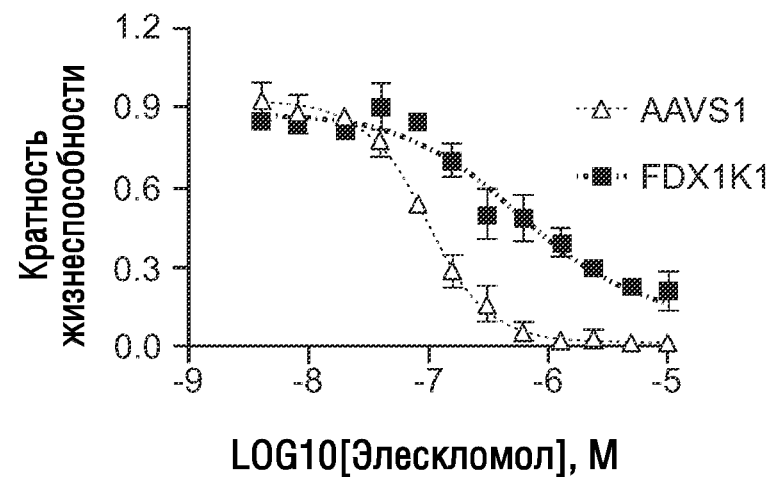
ФИГ.16



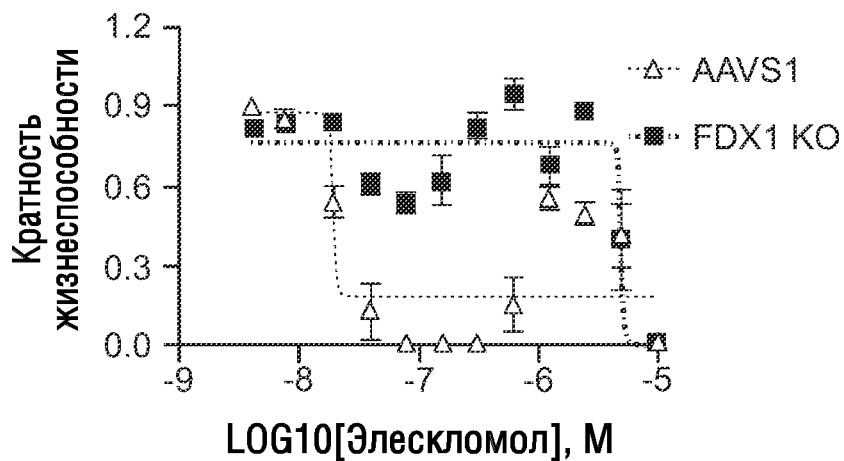
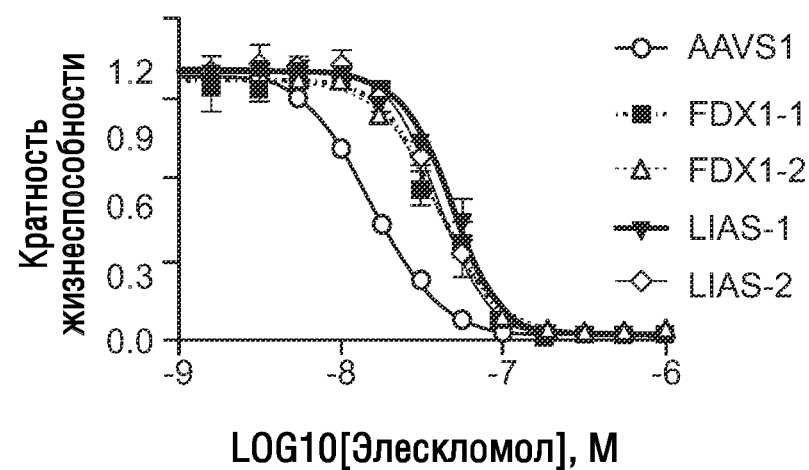
ФИГ.17



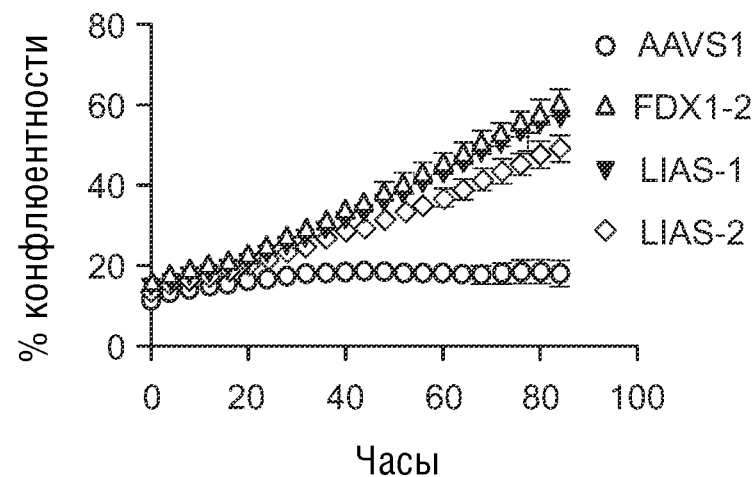
ФИГ.18



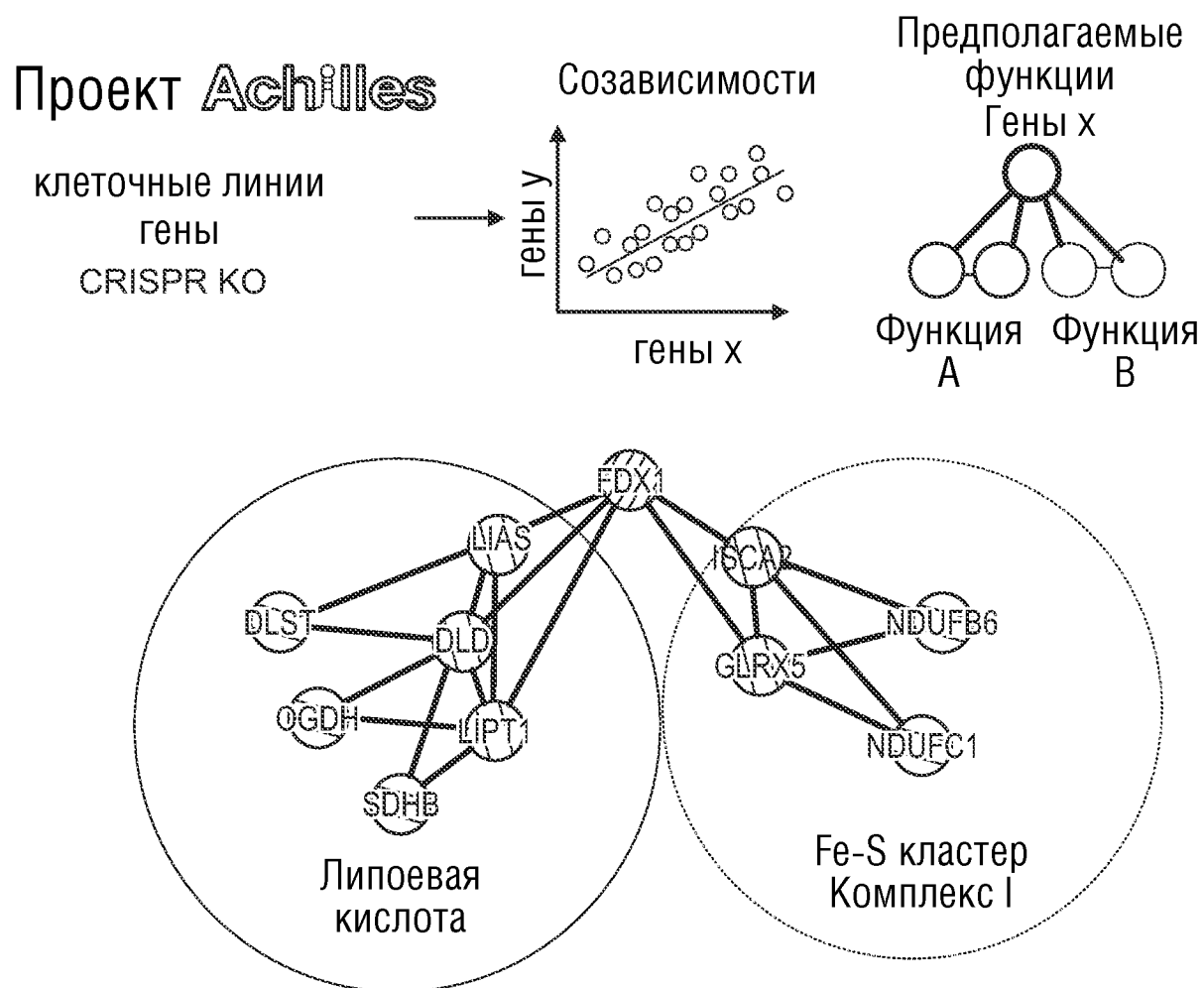
OVISE



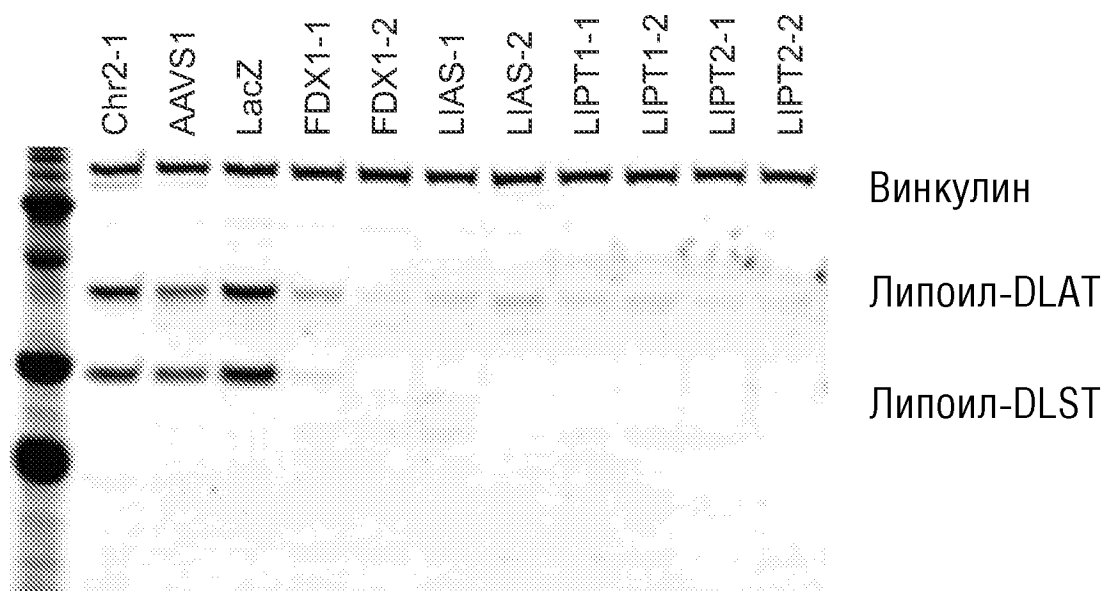
OVISE 20 нМ



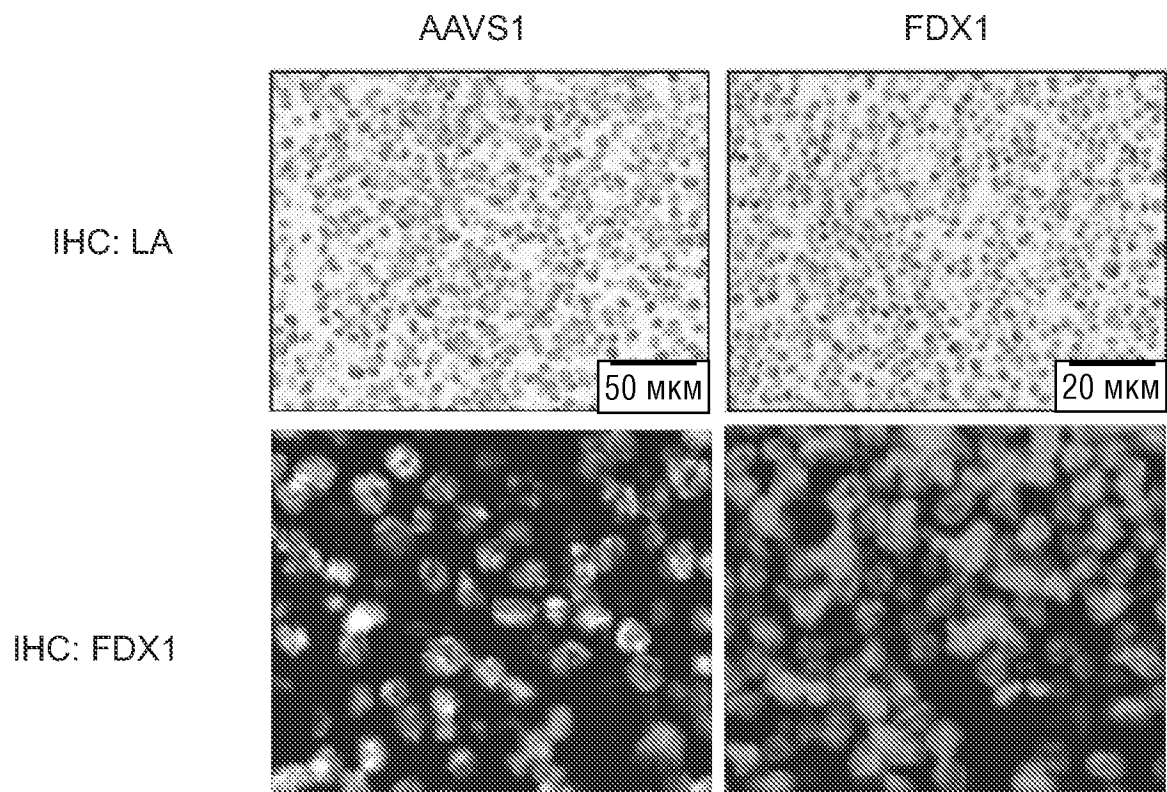
ФИГ.19



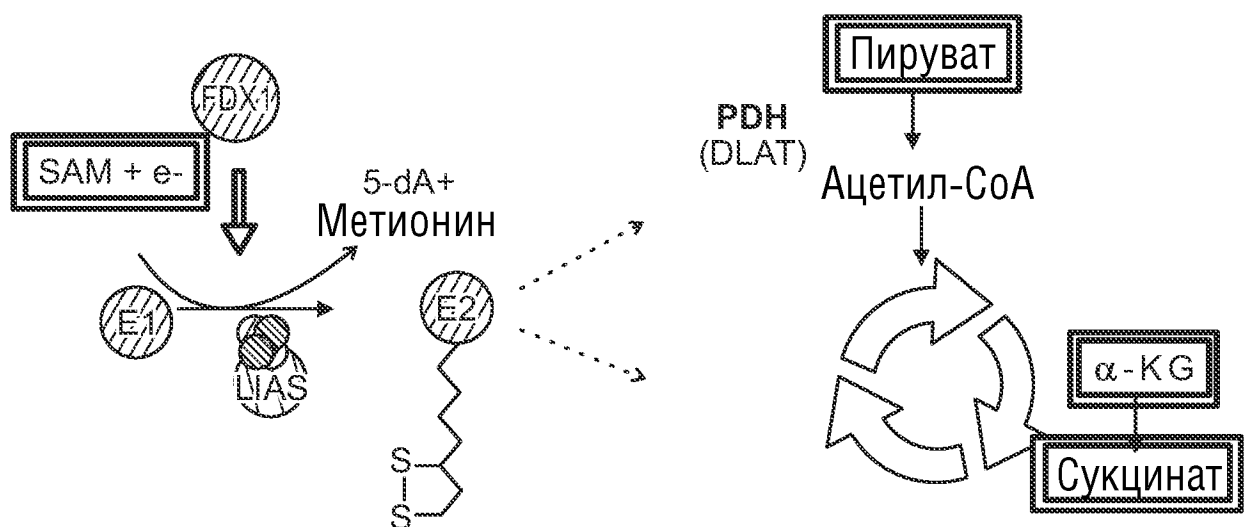
ФИГ.20



ФИГ.21

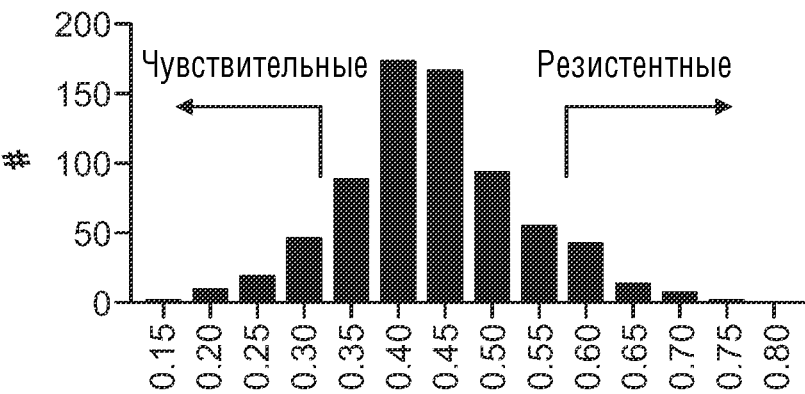


ФИГ.22



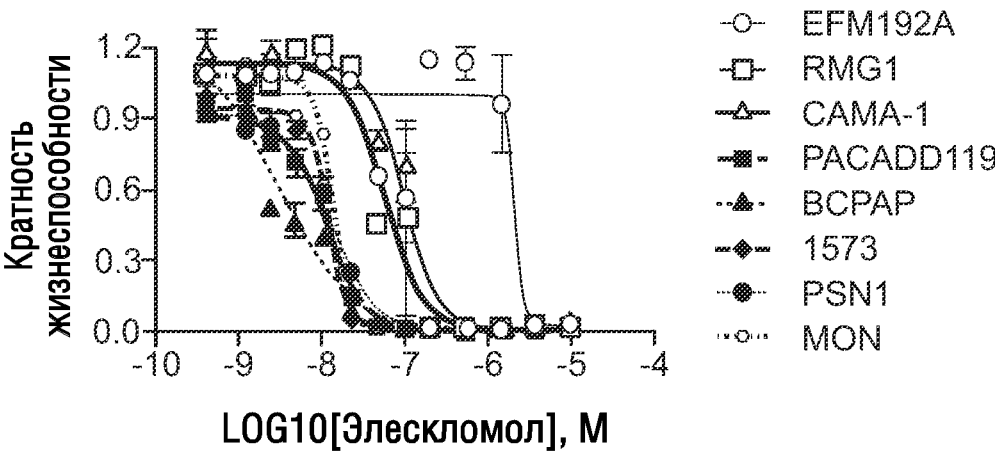
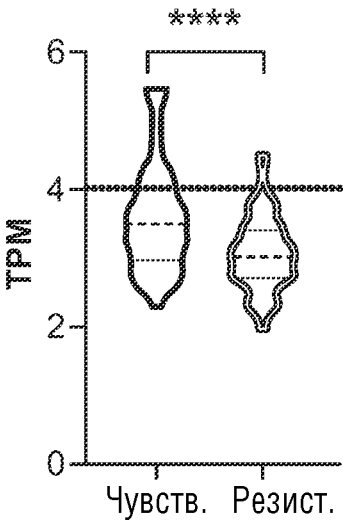
ФИГ.23

Чувствительность к элескломолу PRS800

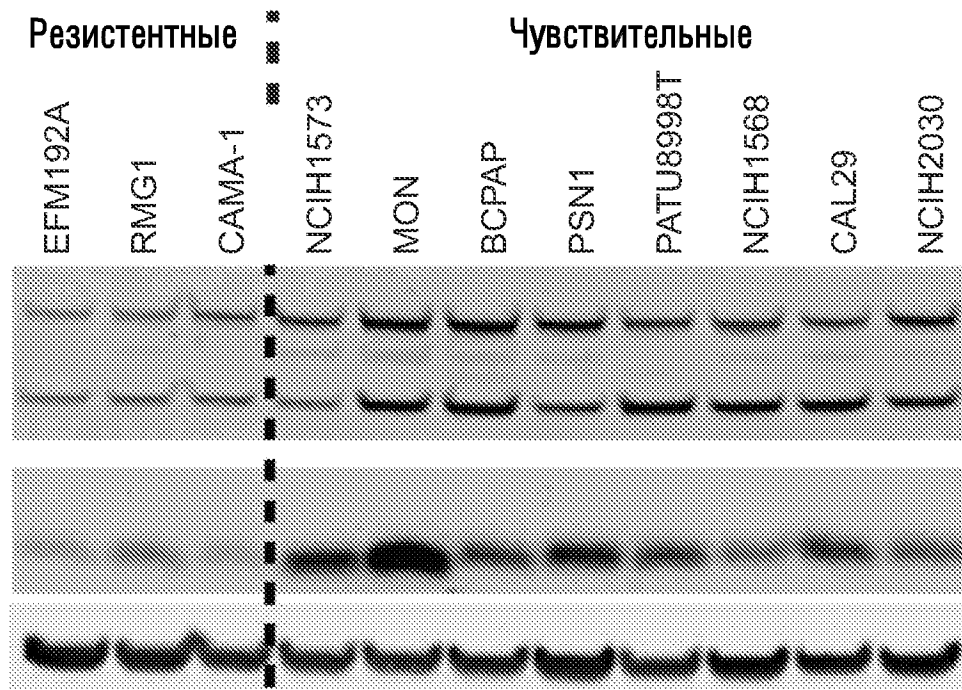


ФИГ.24

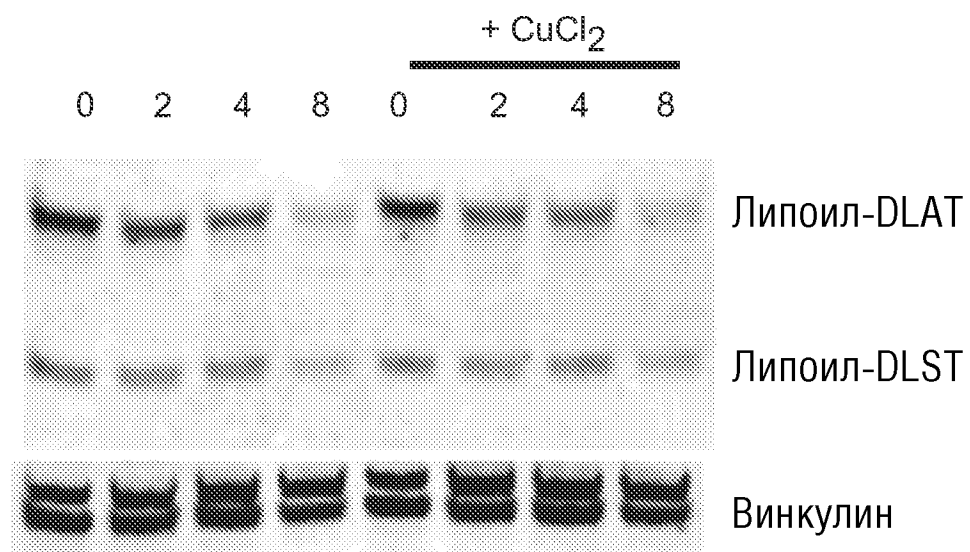
Экспрессия FDX1



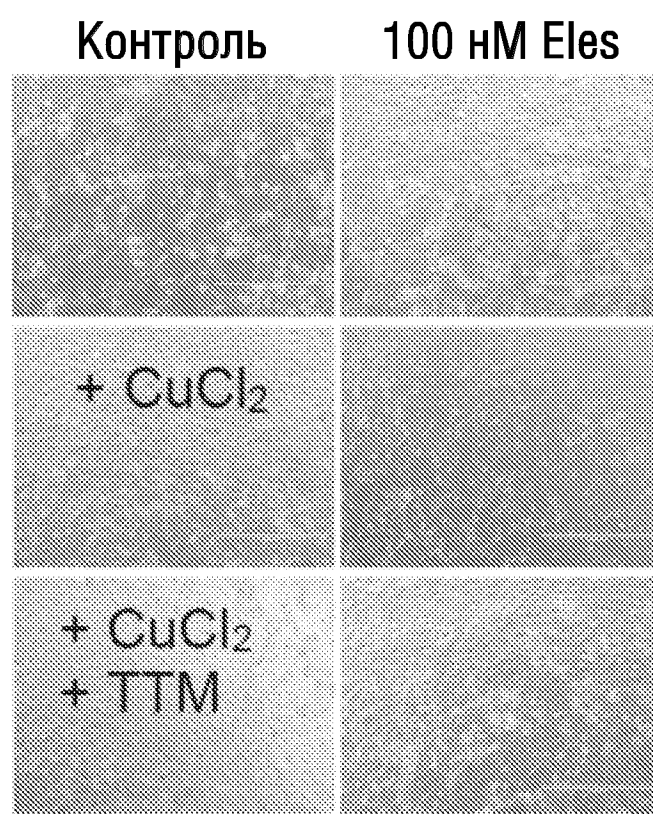
ФИГ.25



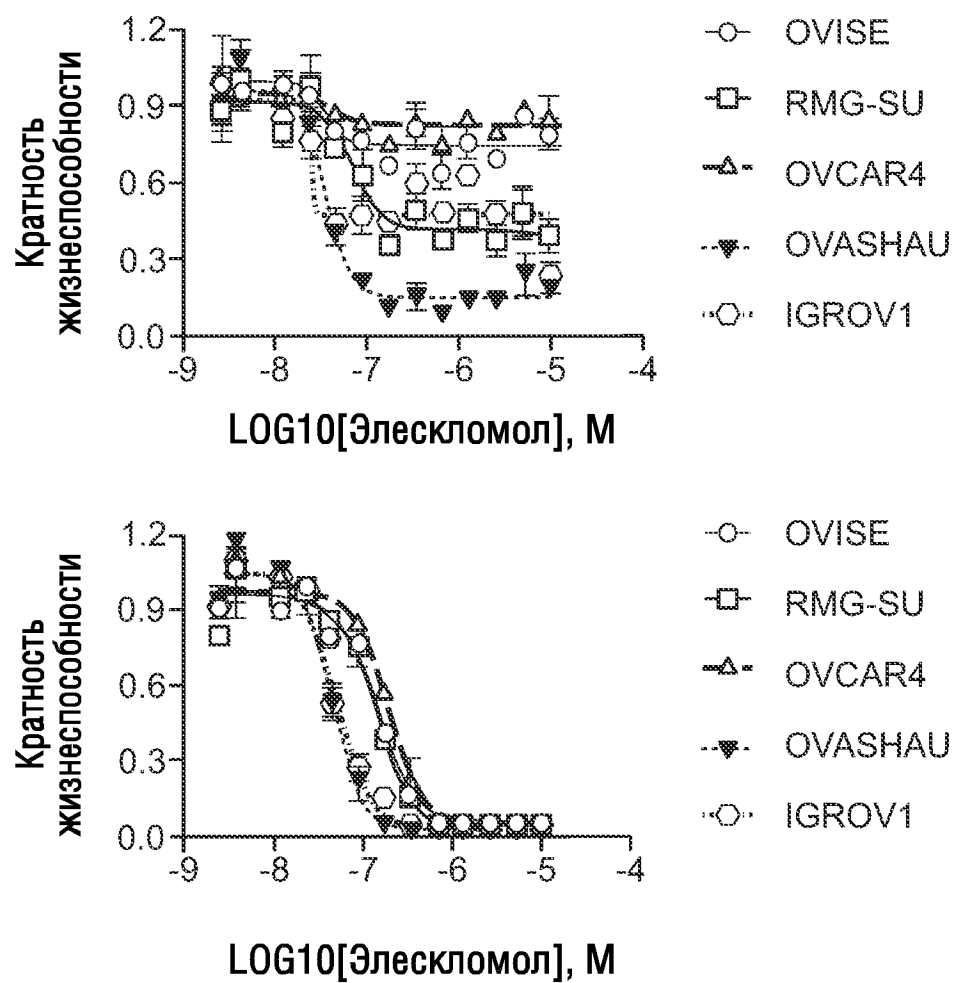
ФИГ.26



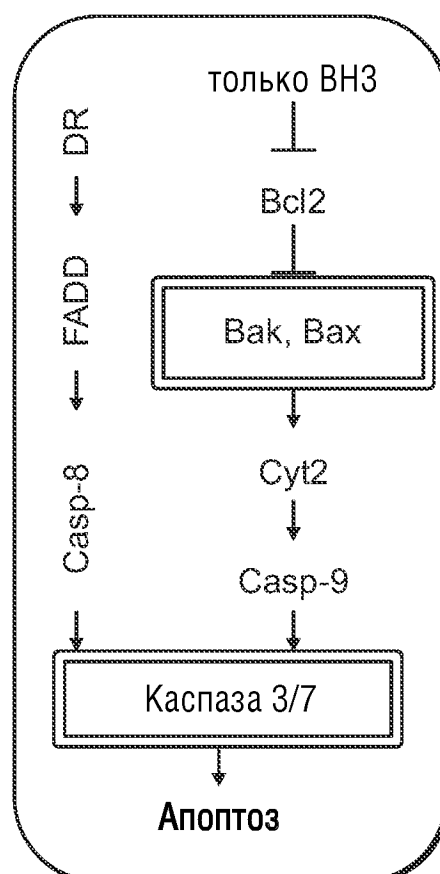
ФИГ.27



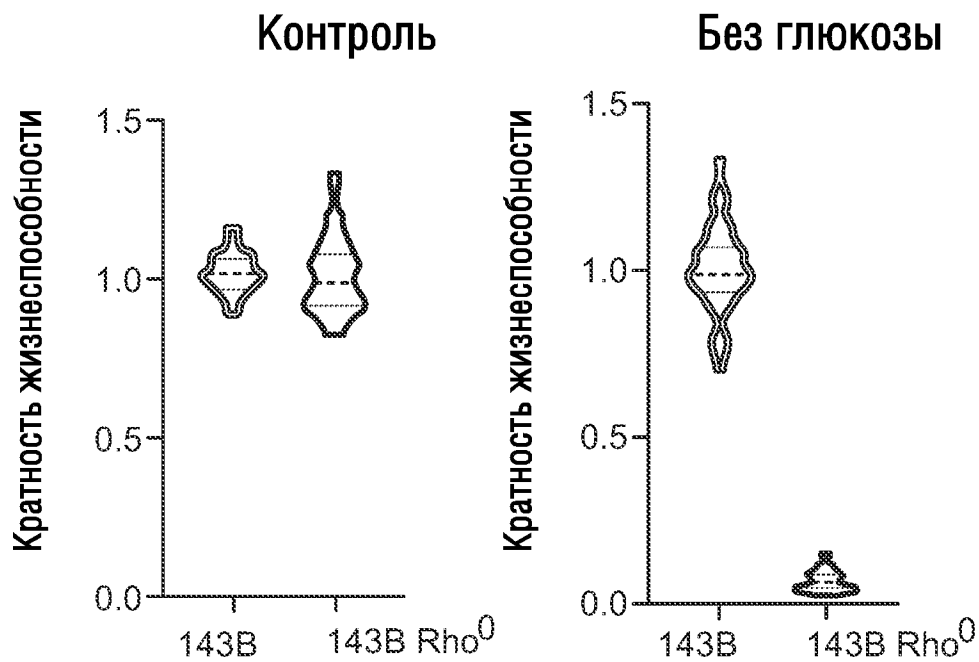
ФИГ.28



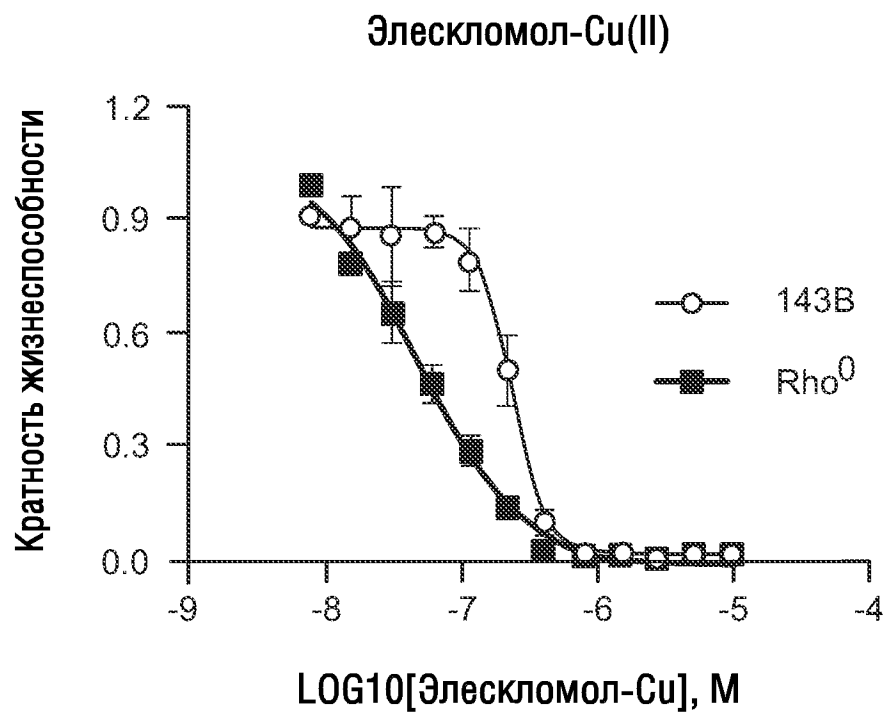
ФИГ.29



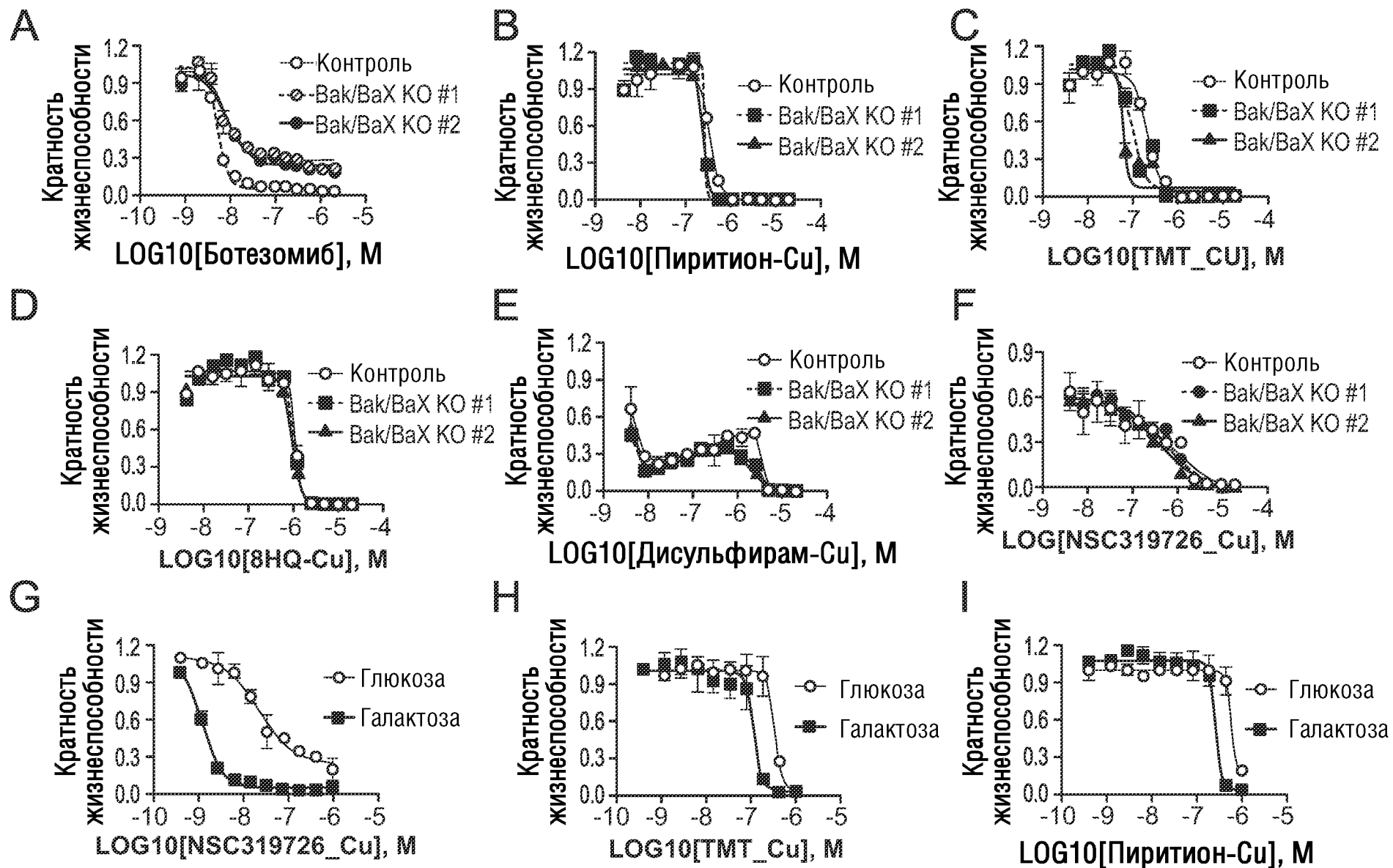
ФИГ.30



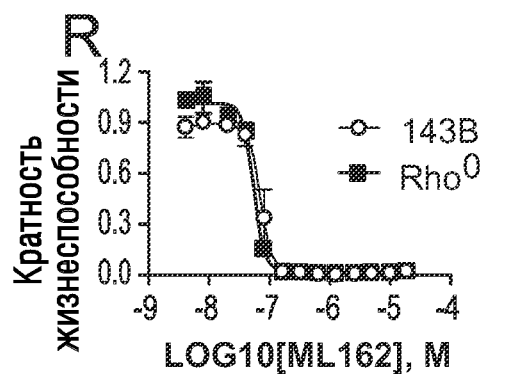
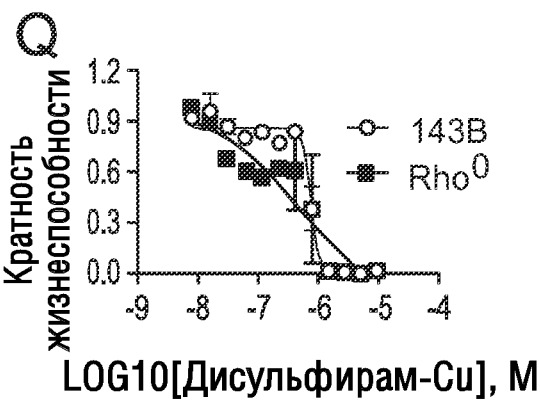
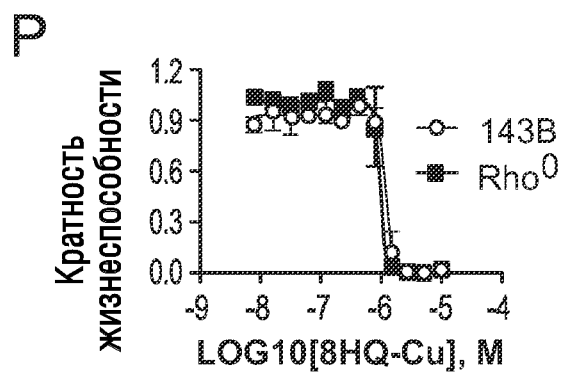
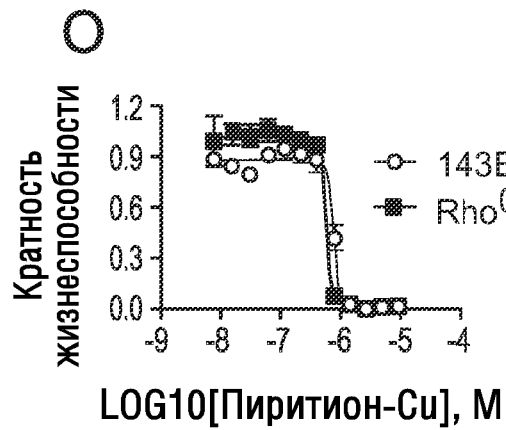
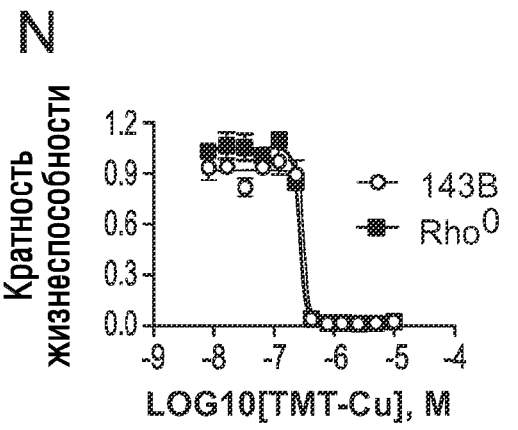
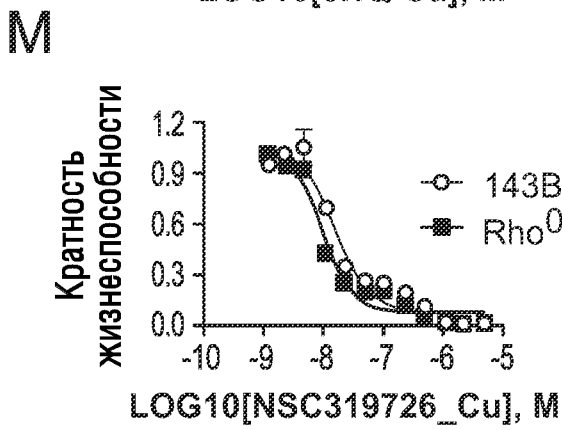
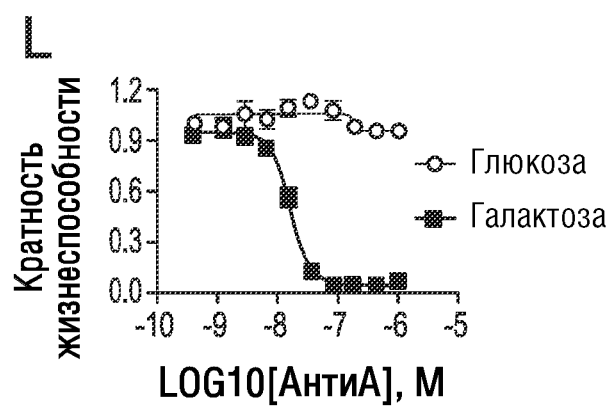
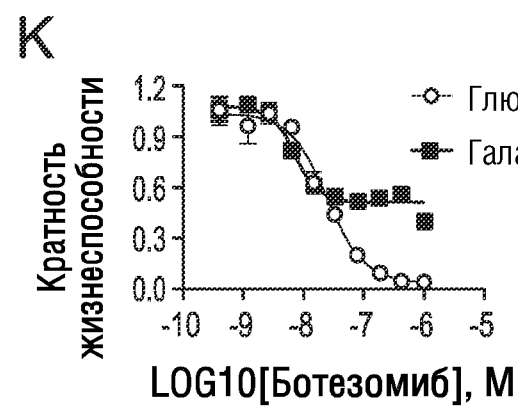
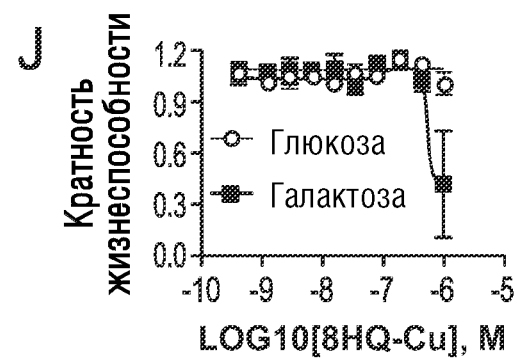
ФИГ.31



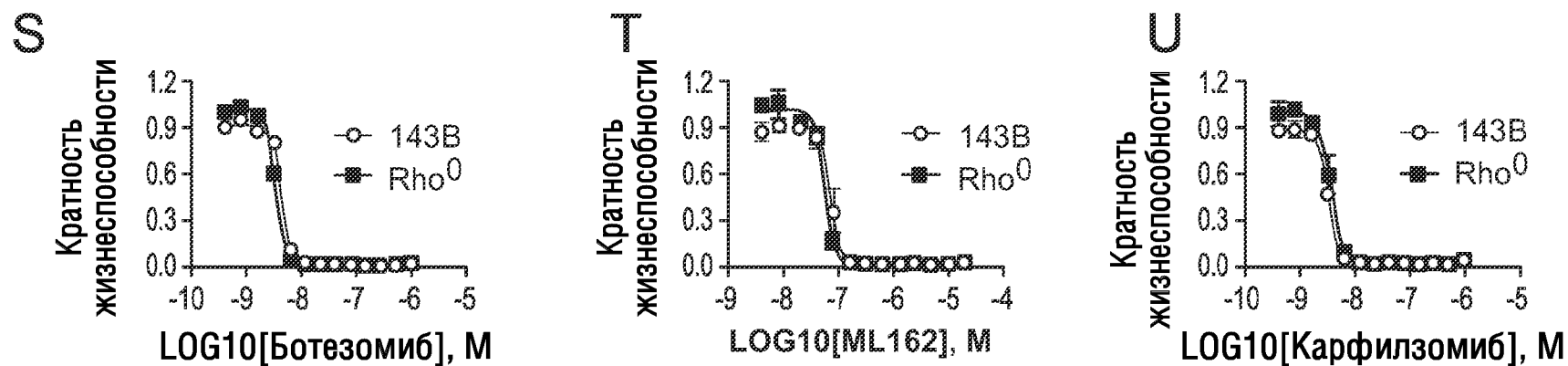
ФИГ.32



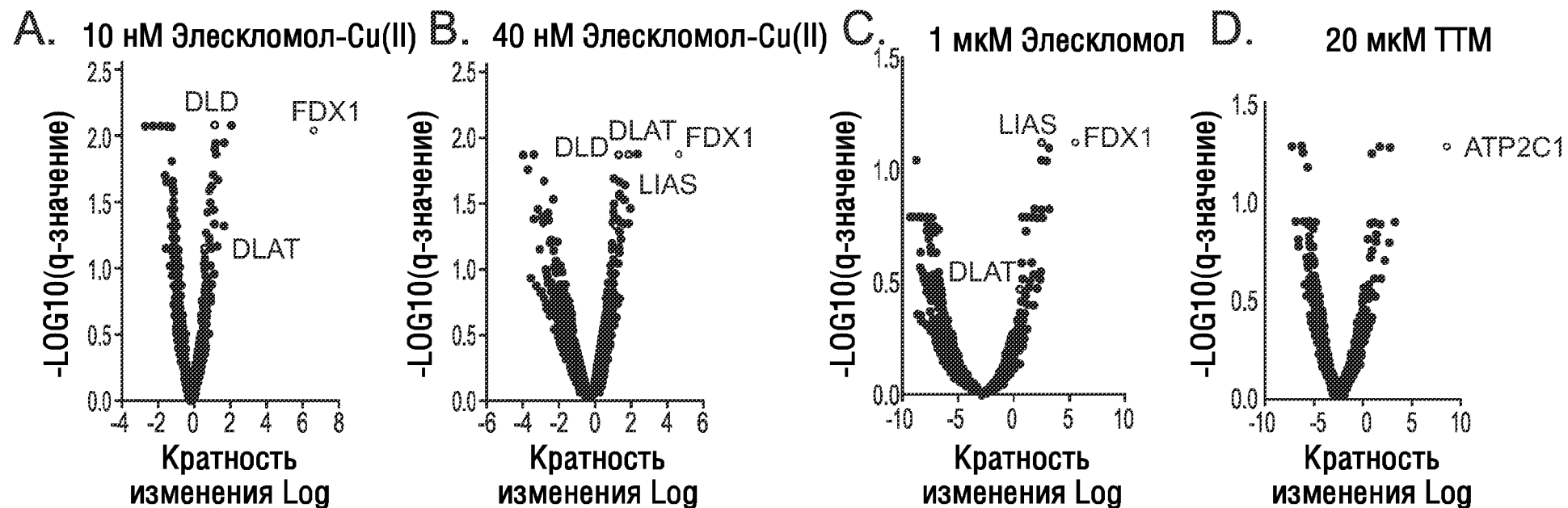
ФИГ.32, продолжение



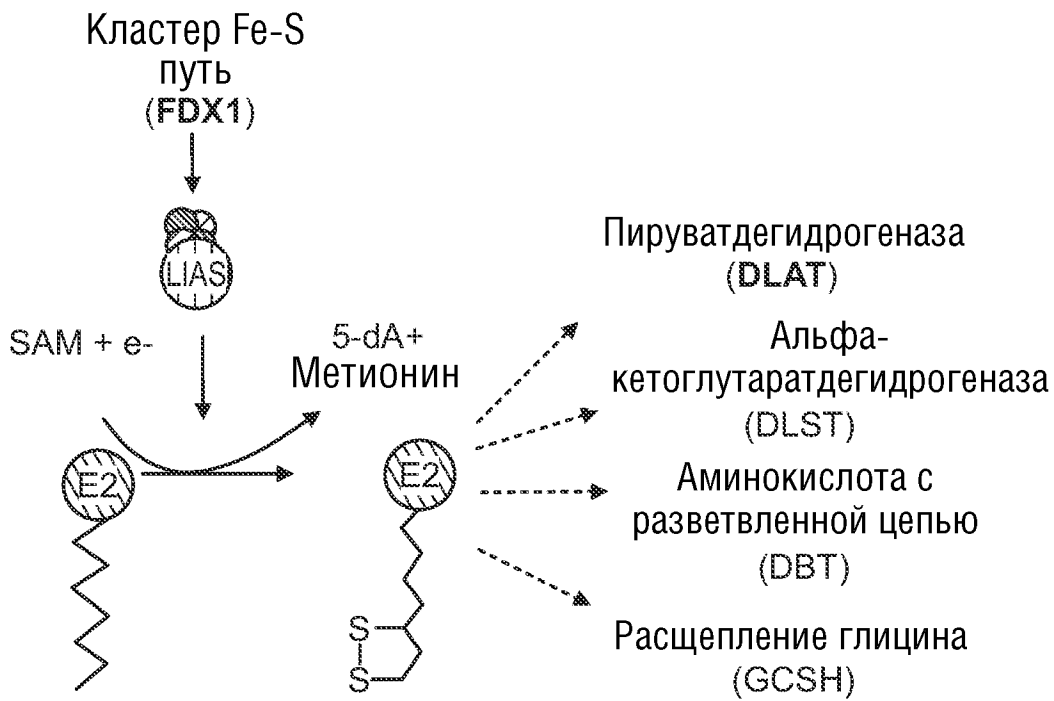
ФИГ.32, продолжение



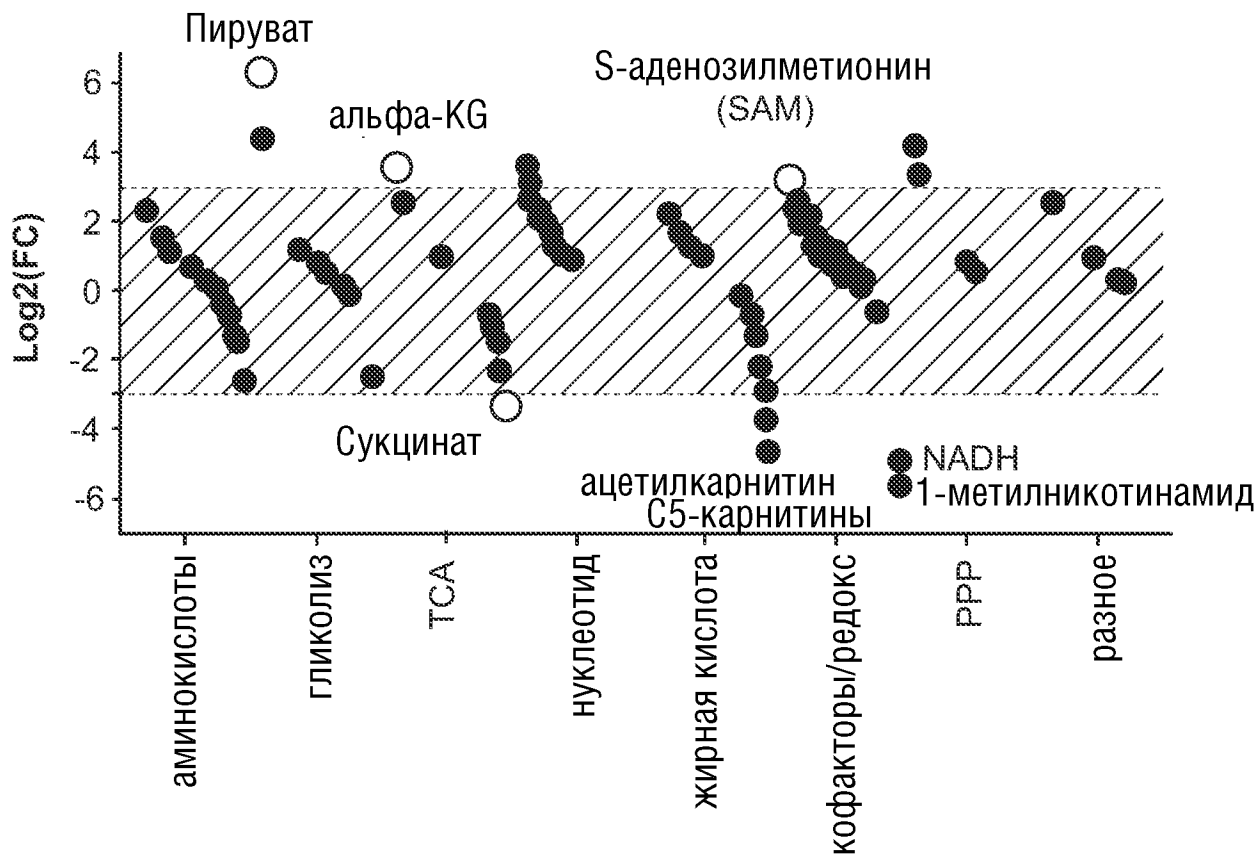
ФИГ.33



ФИГ.34

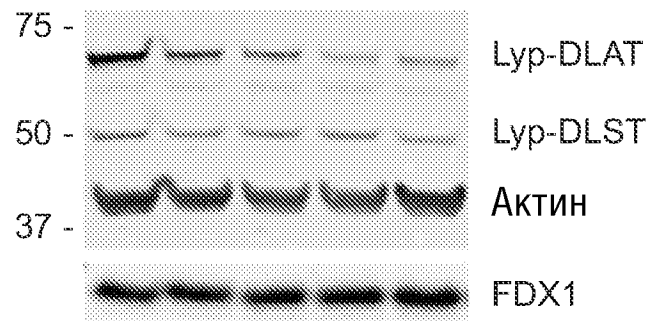


ФИГ.35

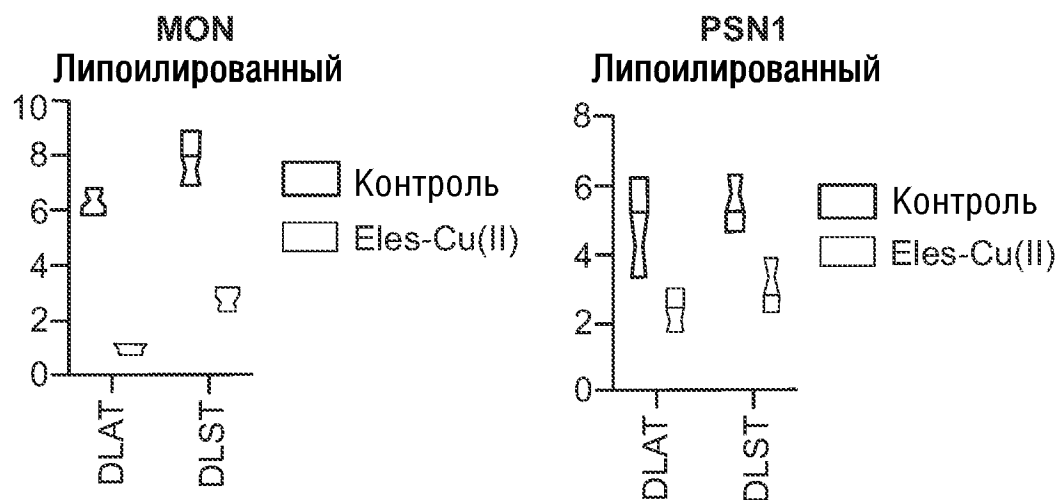


ФИГ.36

Элескломол (нМ) - 10 40 100 200

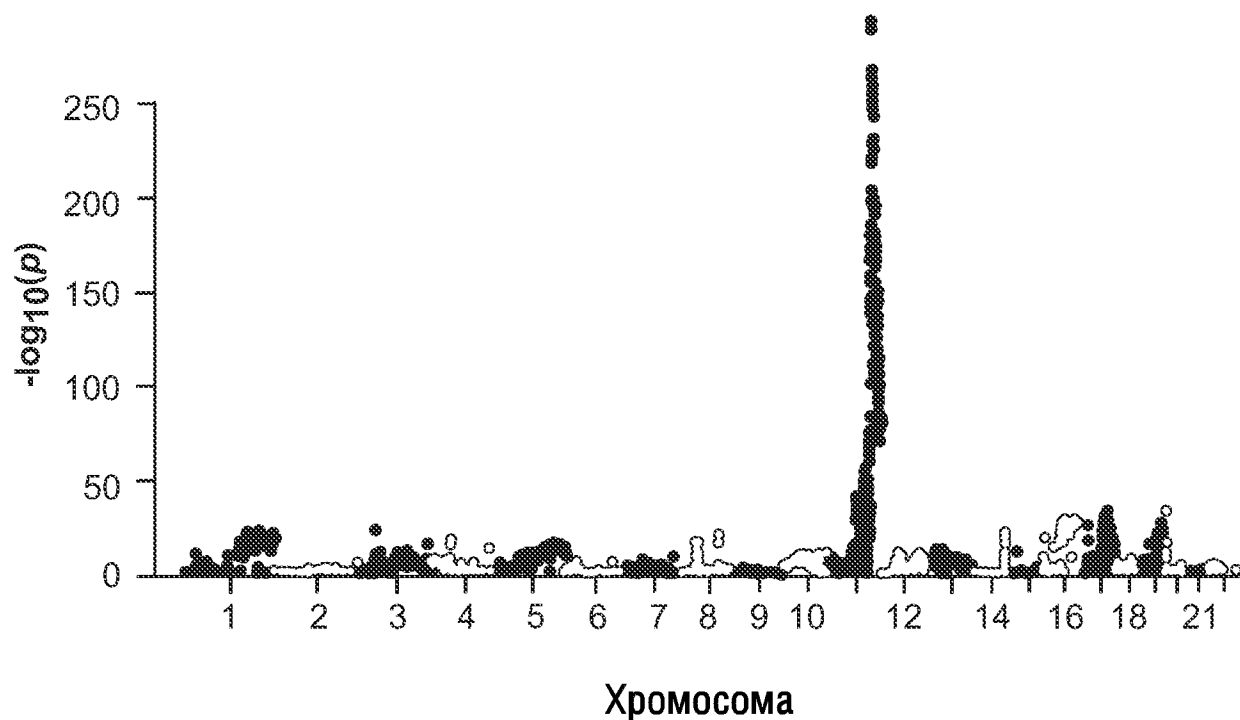


ФИГ.37



ФИГ.38

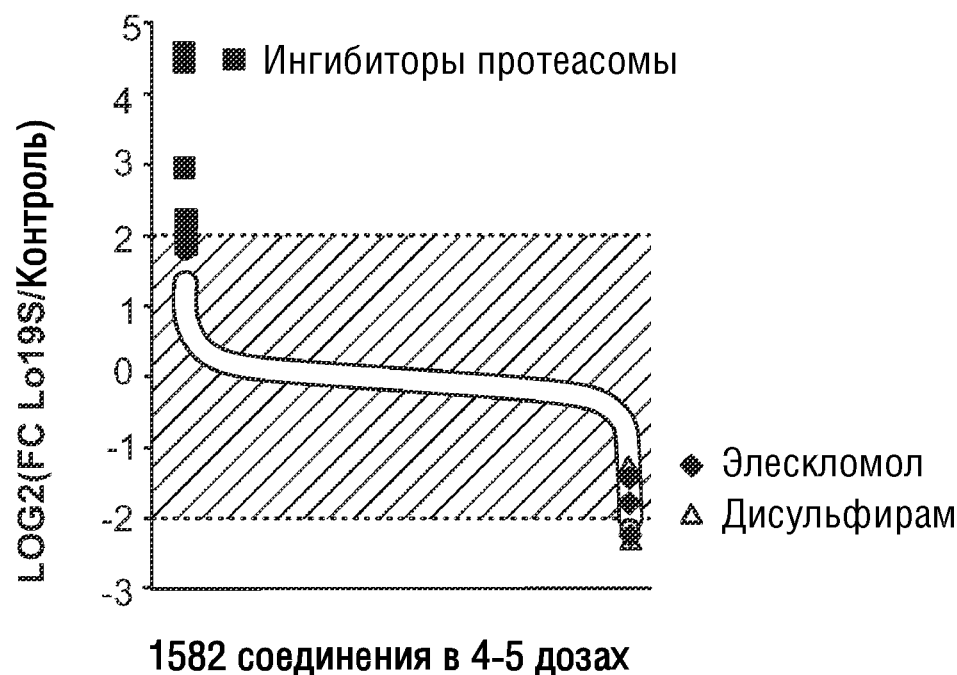
Ассоциации экспрессии CN-FDX1 в TCGA



ФИГ.39

Скрининг лекарственных средств #1

Резистентные к лекарственному средству
(ингибиторы протеасомы) к
чувствительным к лекарственному средству



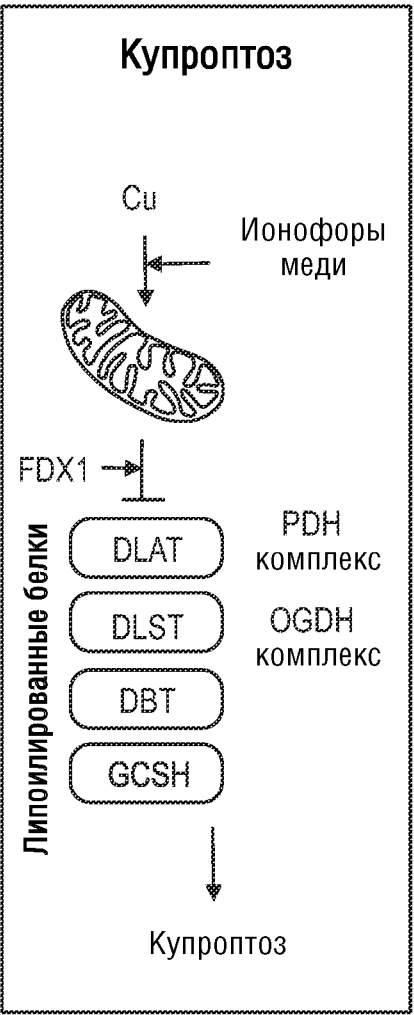
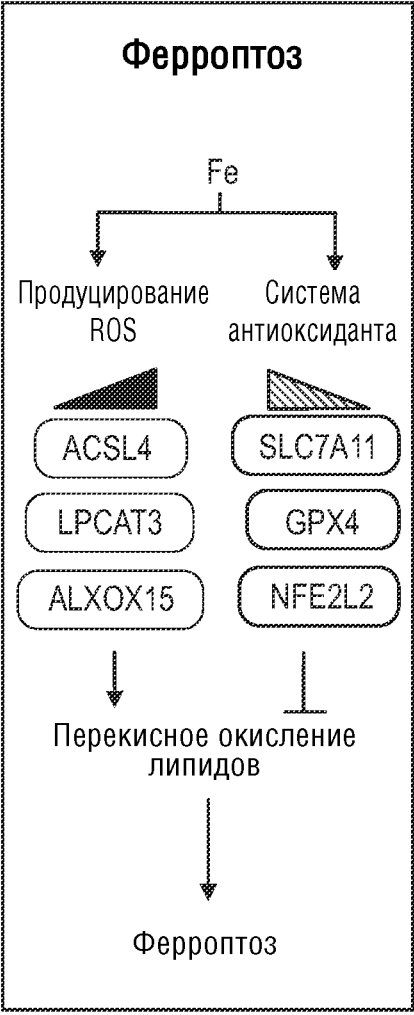
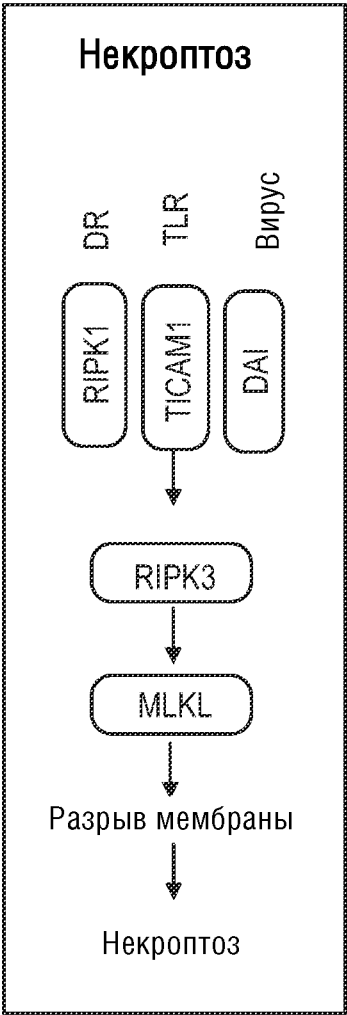
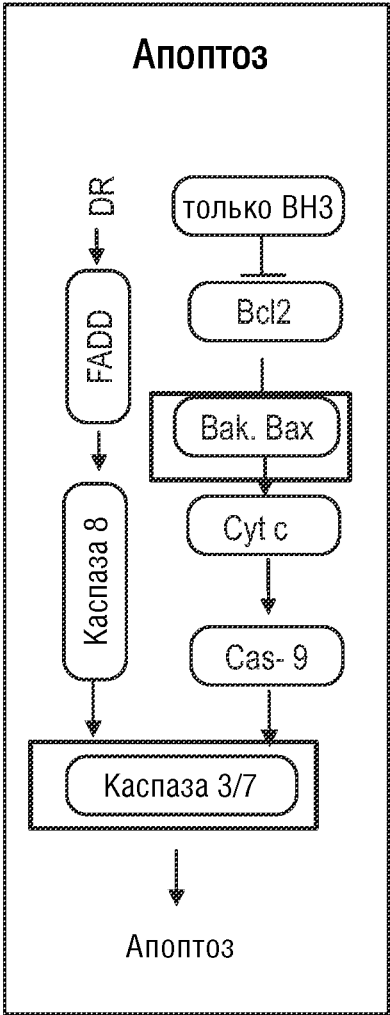
Скрининг лекарственных средств #2

ОХРНOS с высокой глюкозой
к глюкозе (гликолиз)

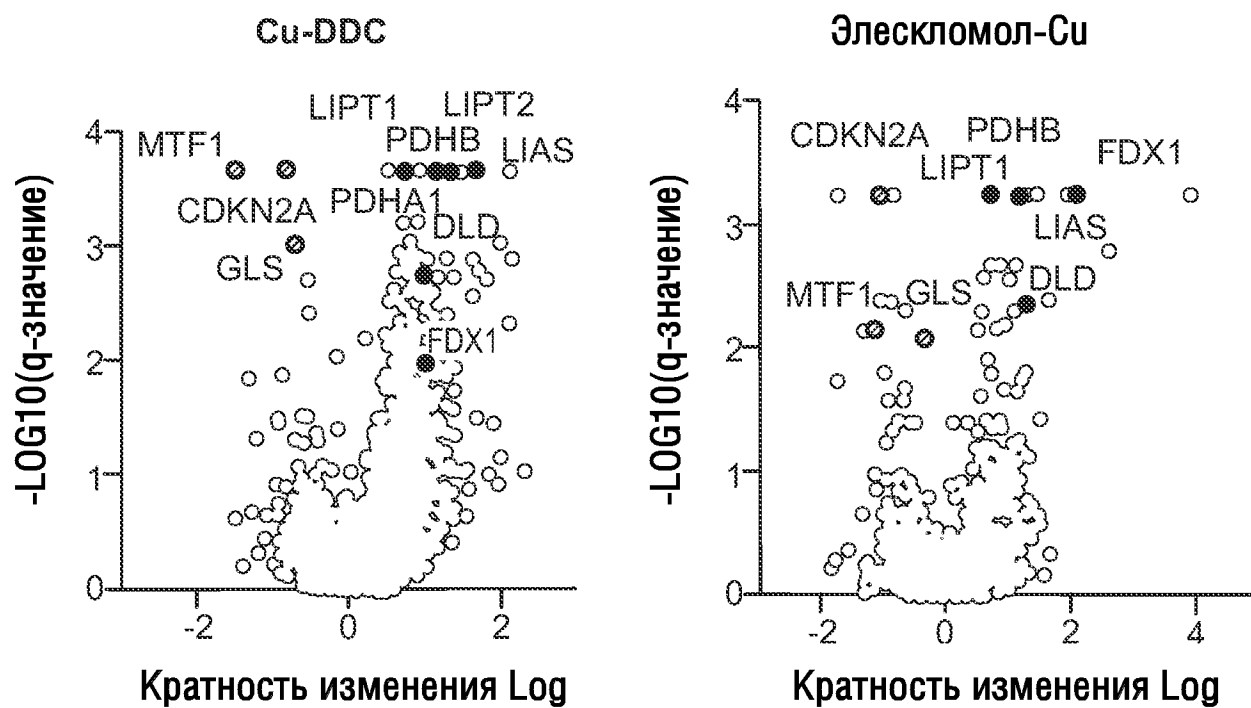


Классический путь гибели клеток

Новый путь гибели клеток



ФИГ.41

путь LAкомплекс PDH

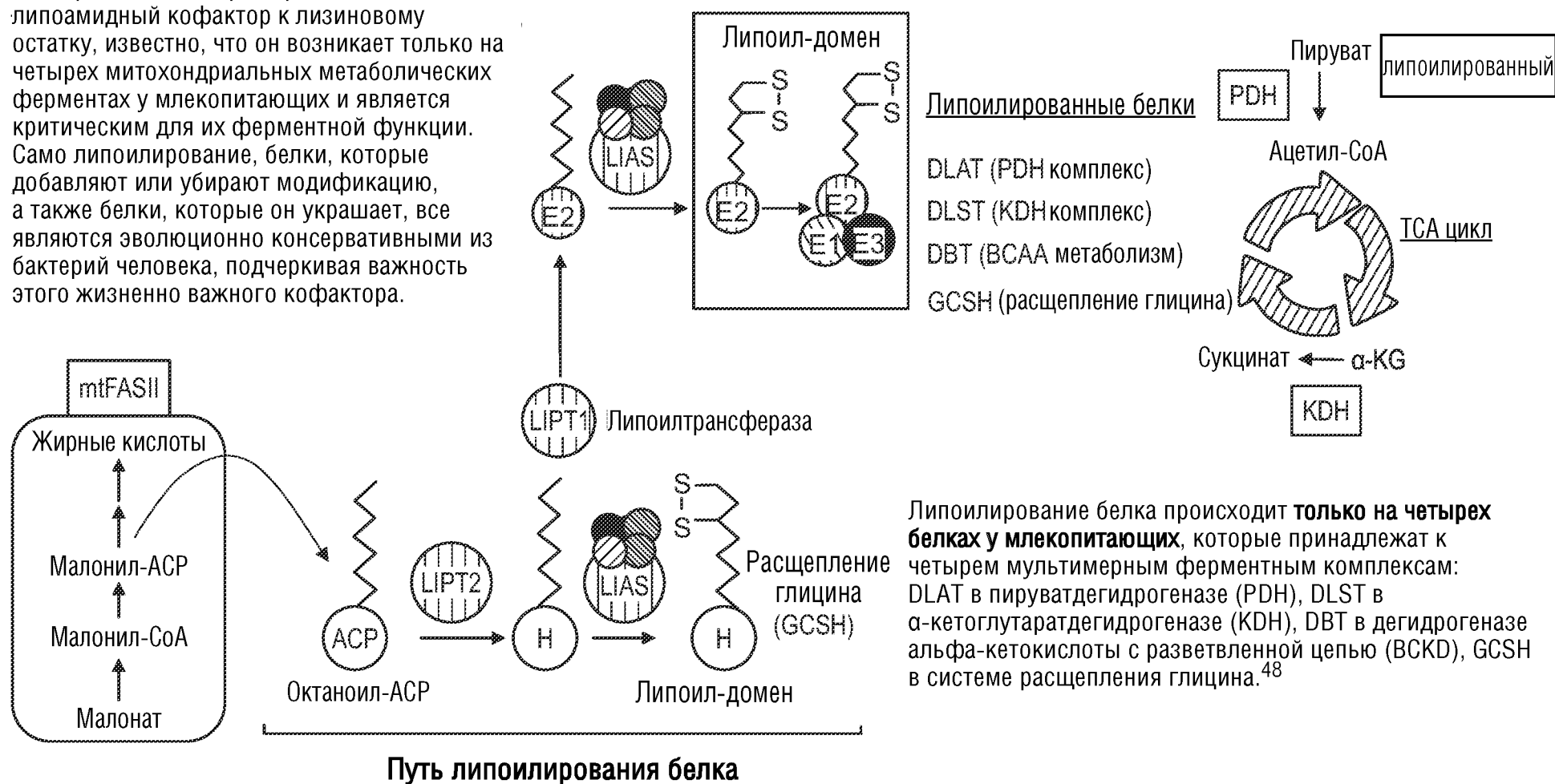
FDX1	LIAS	DLAT
	LIPT1	PDHA1
	DLD	PDHB
гены спасения		

GLS
MTF1
CDKN2A

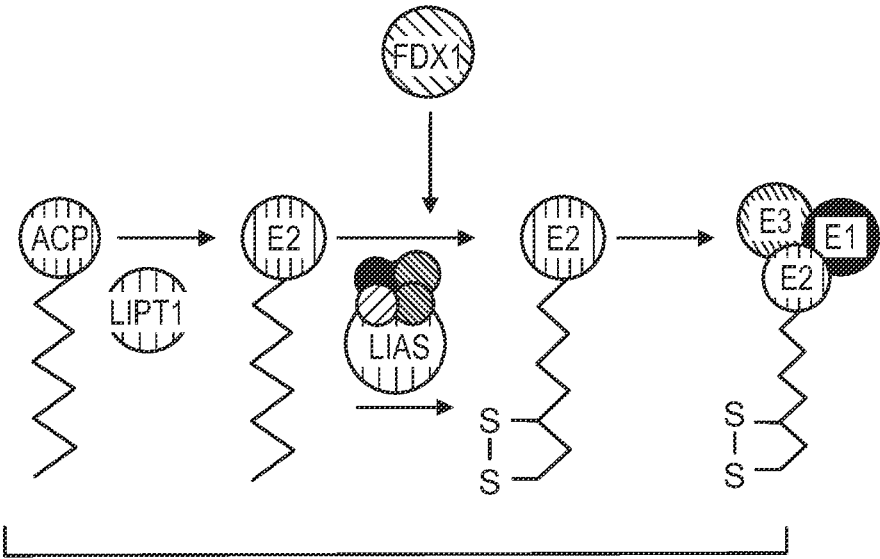
сенсibiliзирующие гены

ФИГ.42

Липоилирование представляет собой ковалентную пост-трансляционную модификацию, которая присоединяет липоамидный кофактор к лизиновому остатку, известно, что он возникает только на четырех митохондриальных метаболических ферментах у млекопитающих и является критическим для их ферментной функции. Само липоилирование, белки, которые добавляют или убирают модификацию, а также белки, которые он украшает, все являются эволюционно консервативными из бактерий человека, подчеркивая важность этого жизненно важного кофактора.



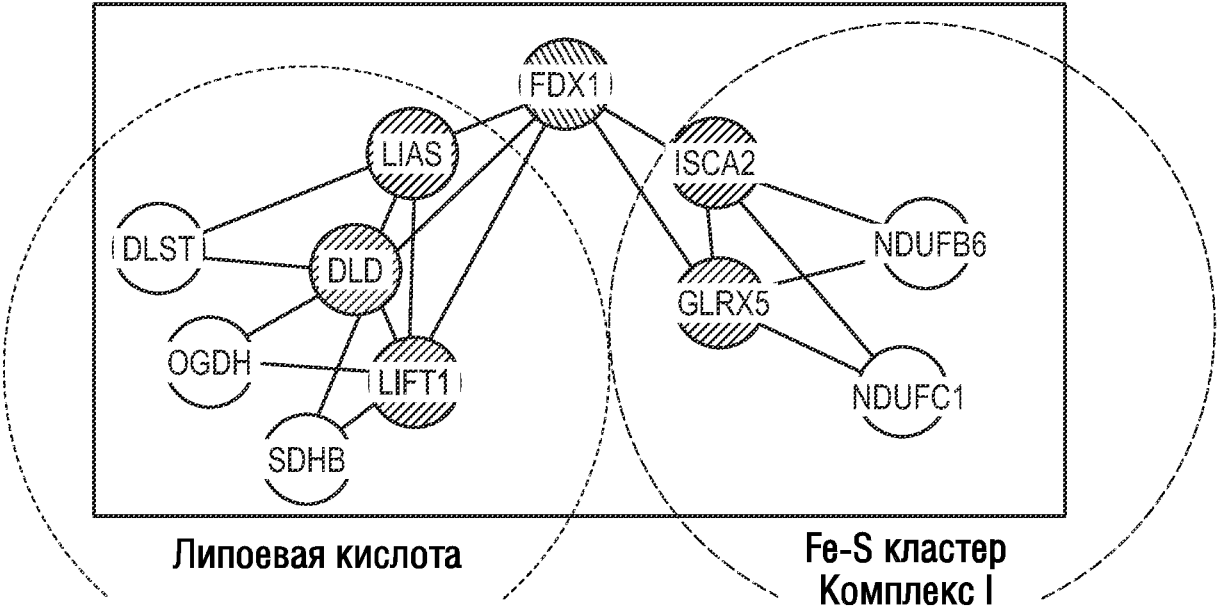
ФИГ.43



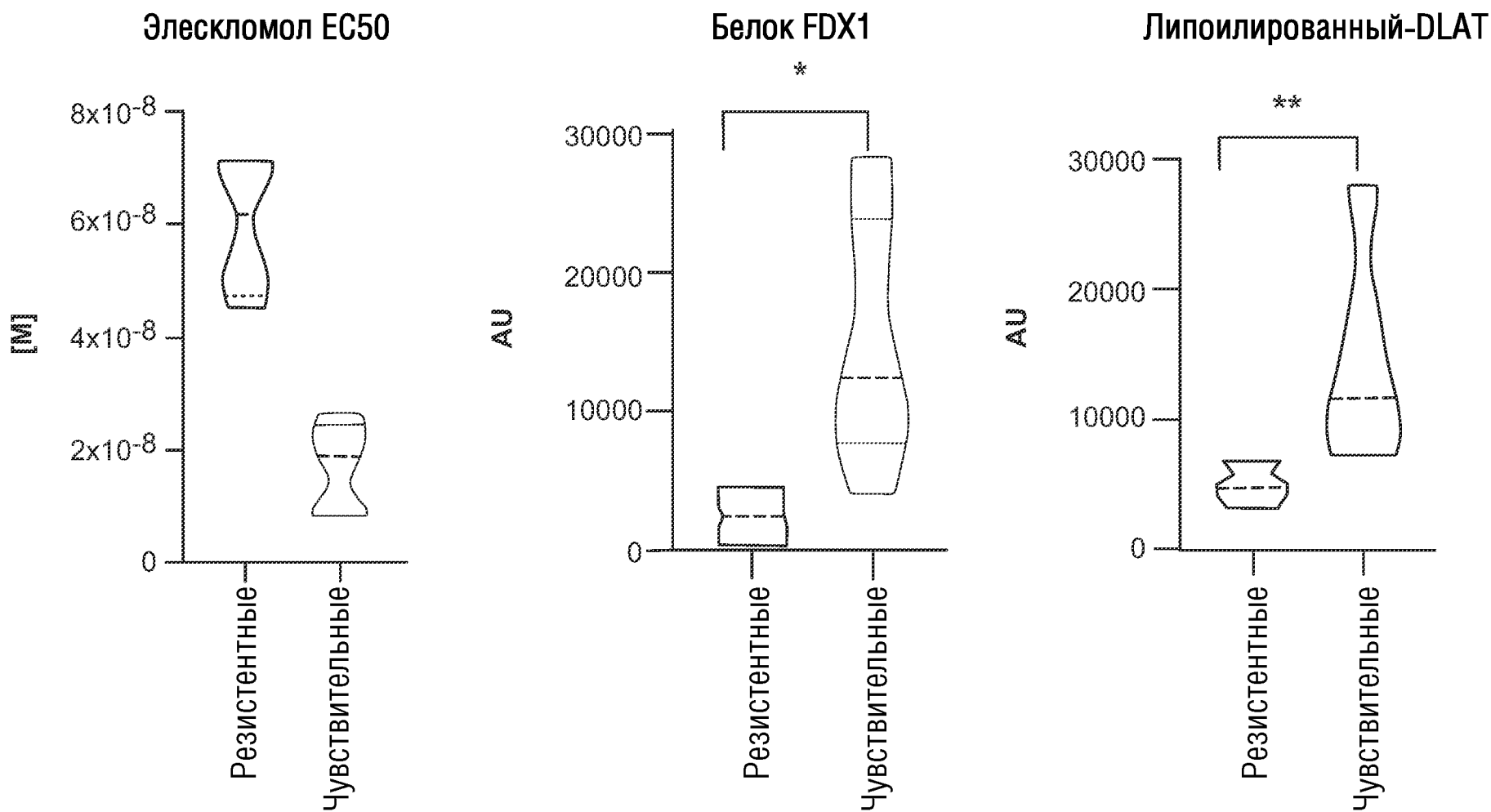
Путь липоилирования белка

Известные липоилированные белки

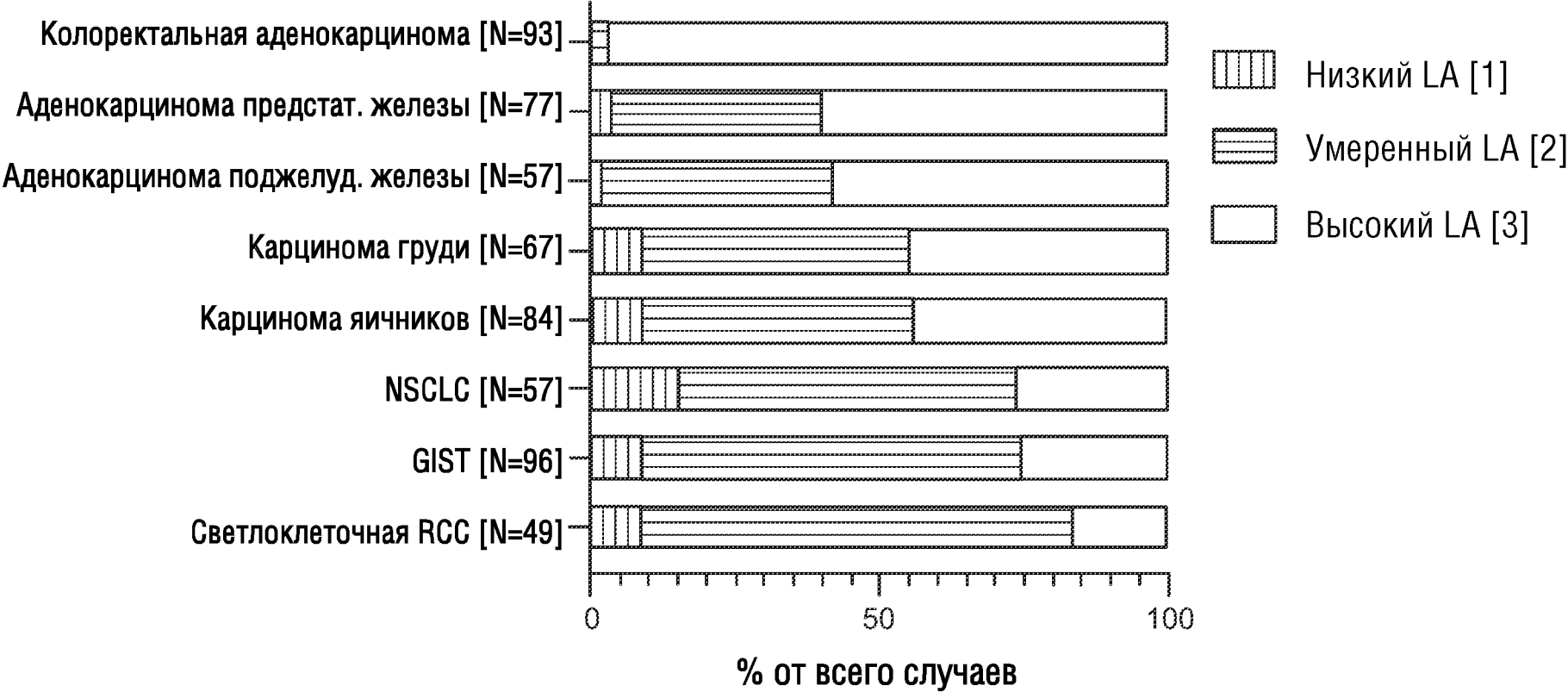
- DLAT**
(комплекс пируватдегидрогеназы)
- DLST**
(комплекс оксоглутаратдегидрогеназы)
- DBT**
(комплекс дегидрогеназы α-кетокислоты с разветвленной цепью)
- GCSH**
(система расщепления глицина)



ФИГ.44



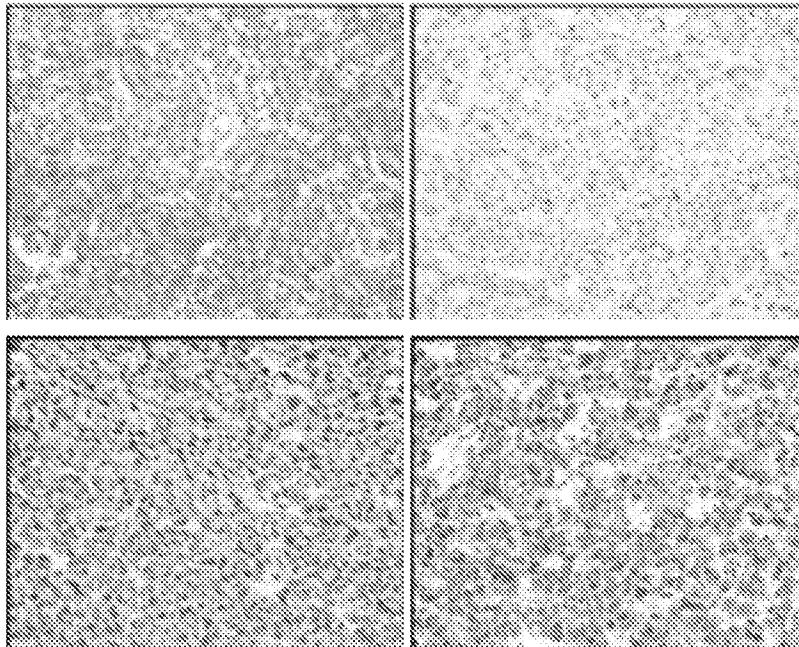
ФИГ.45



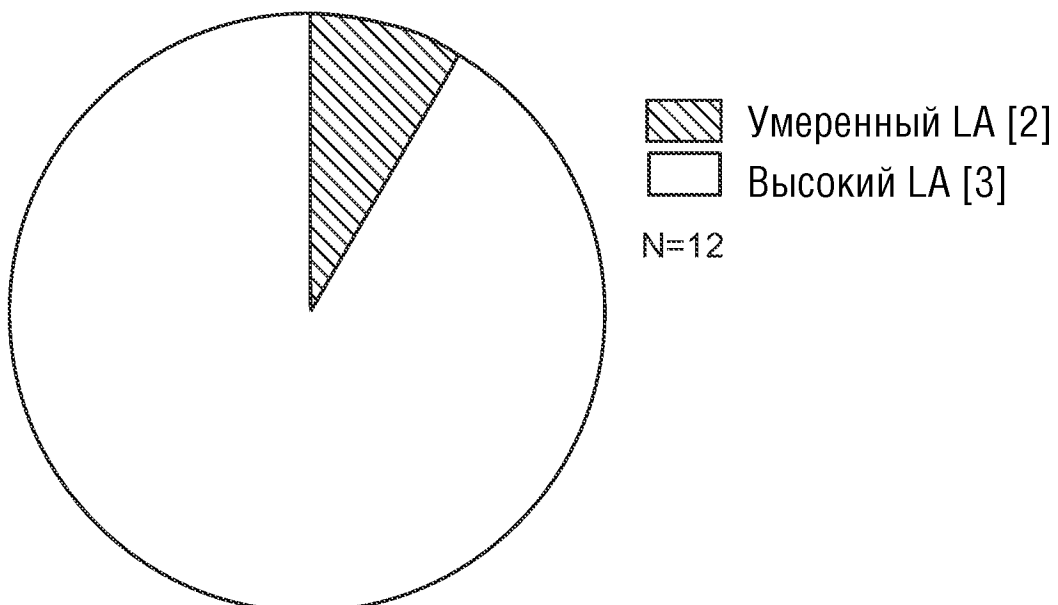
ФИГ.46

Желудочно-кишечная стромальная опухоль [GIST]

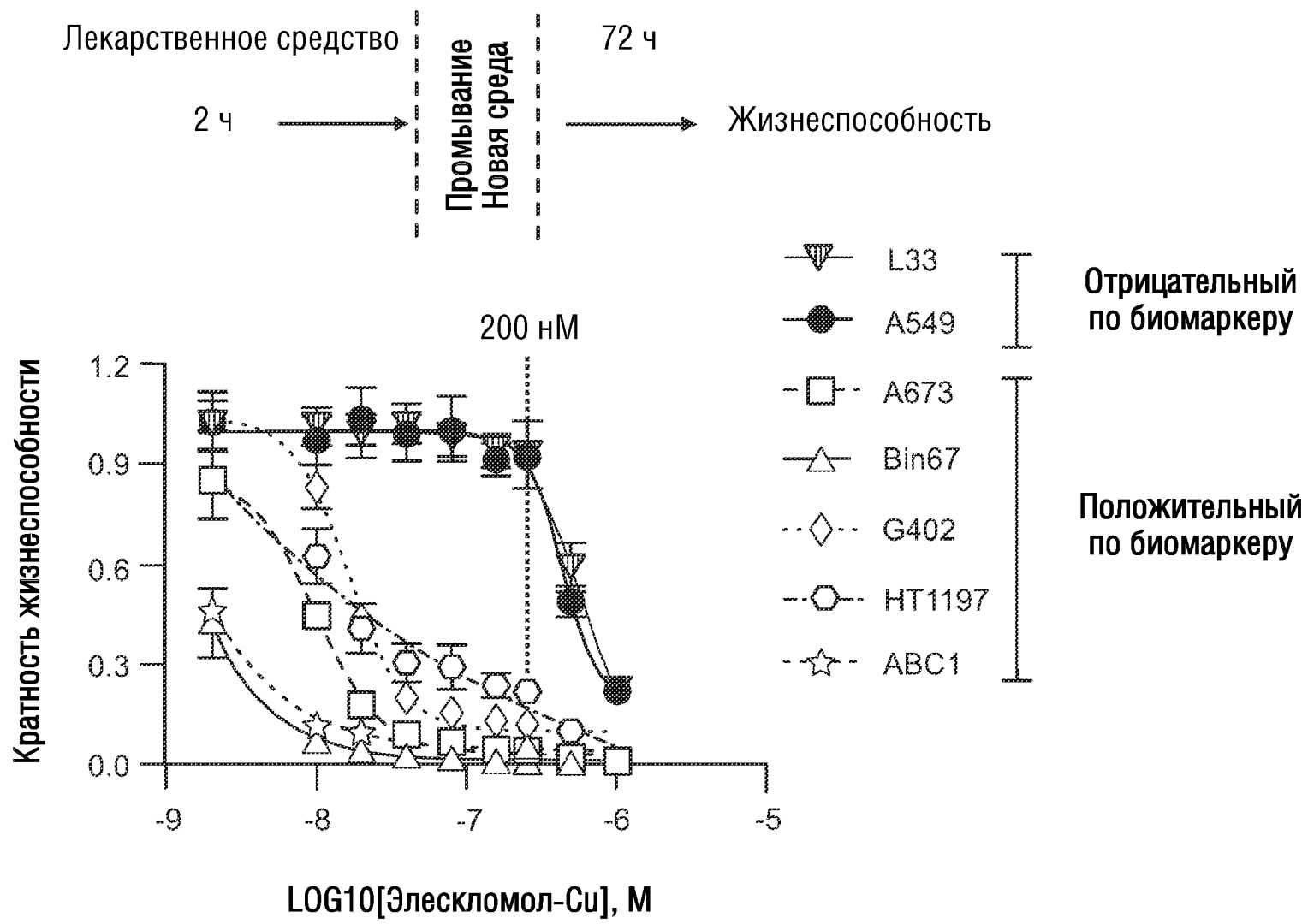
Низкое липоилирование белка

Высокое липоилирование белка
с дефицитом SDH

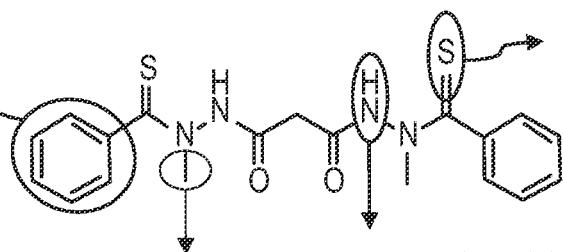
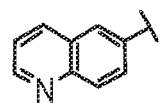
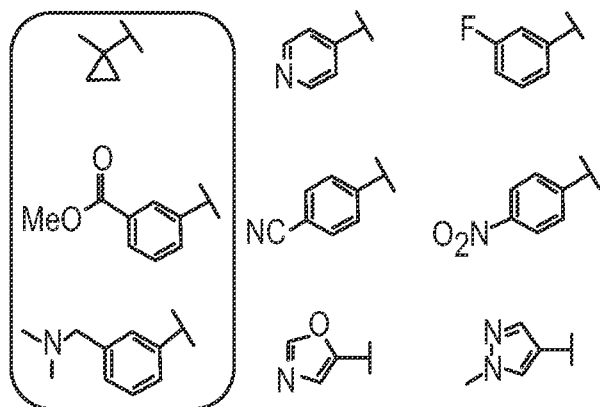
Дефицитная-GIST по SDH (сукцинатдегидрогеназе)



ФИГ.47

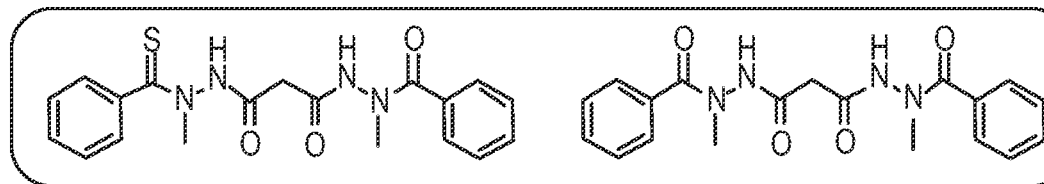


ФИГ.48

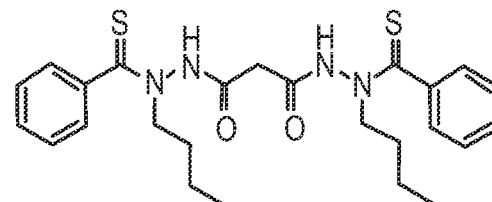
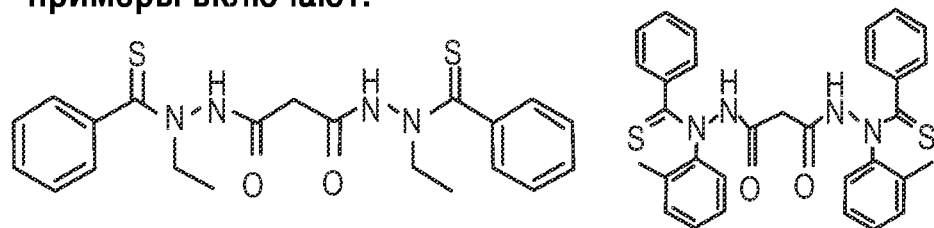
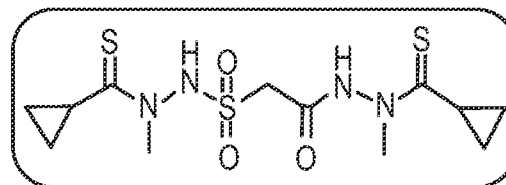


- SAR -
- примеры включают:

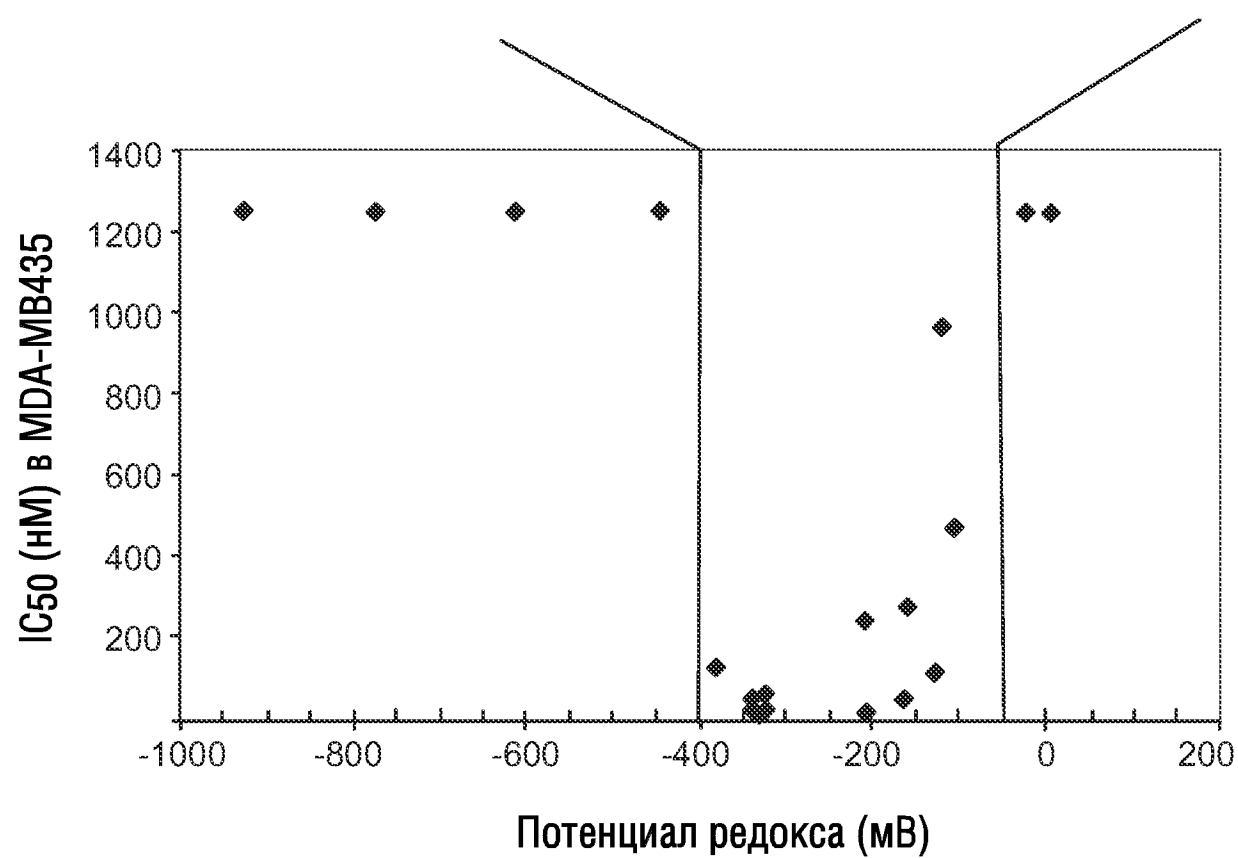
- примеры включают:



- примеры включают:



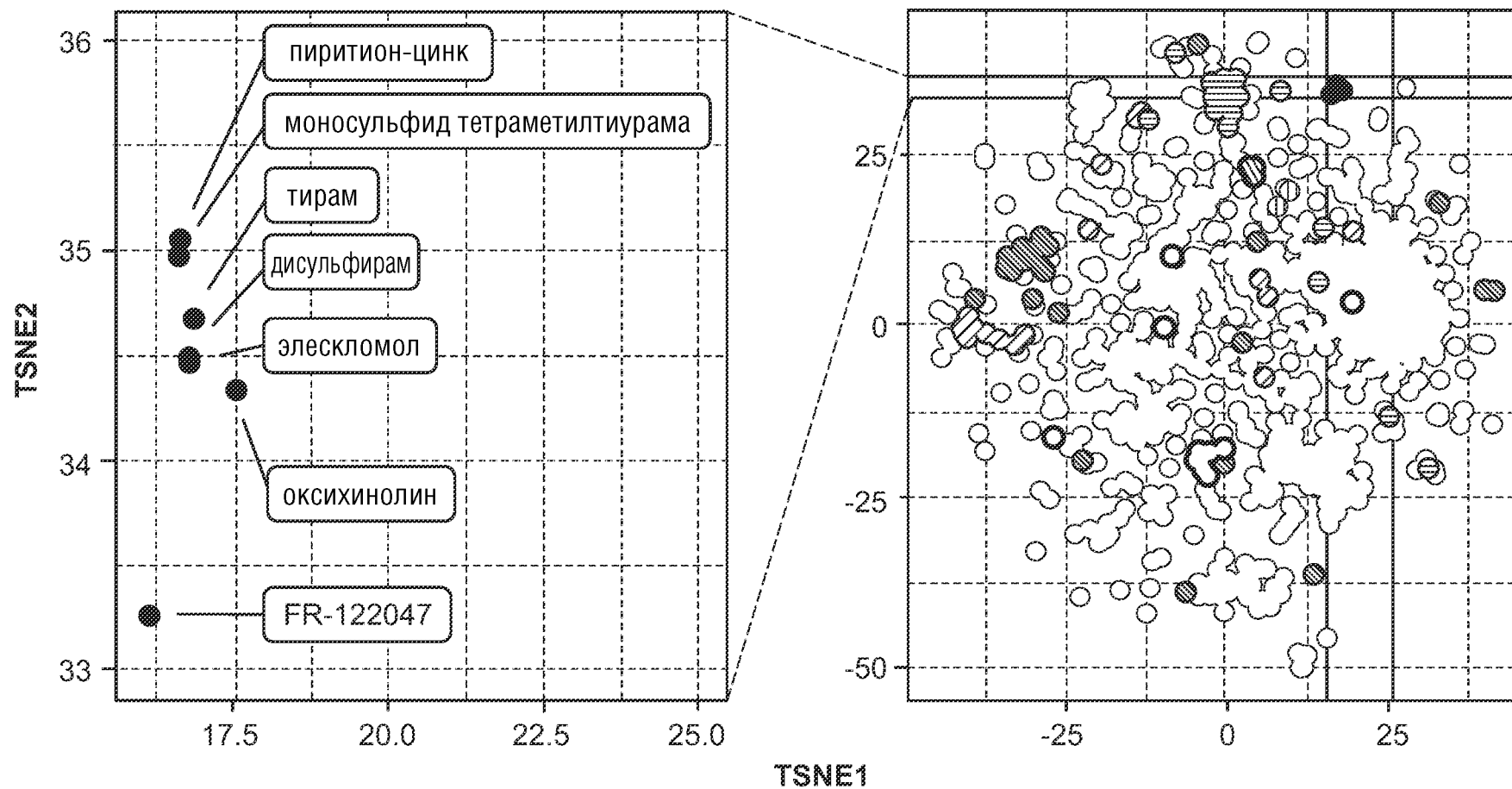
ФИГ.49



ФИГ.50

Кластер ионофоров меди в пространстве лекарственного средства

Вторичный скрининг перенацеленного PRISM, который включает оценки ингибирования роста для 1448 лекарственных средств против 489 клеточных линий

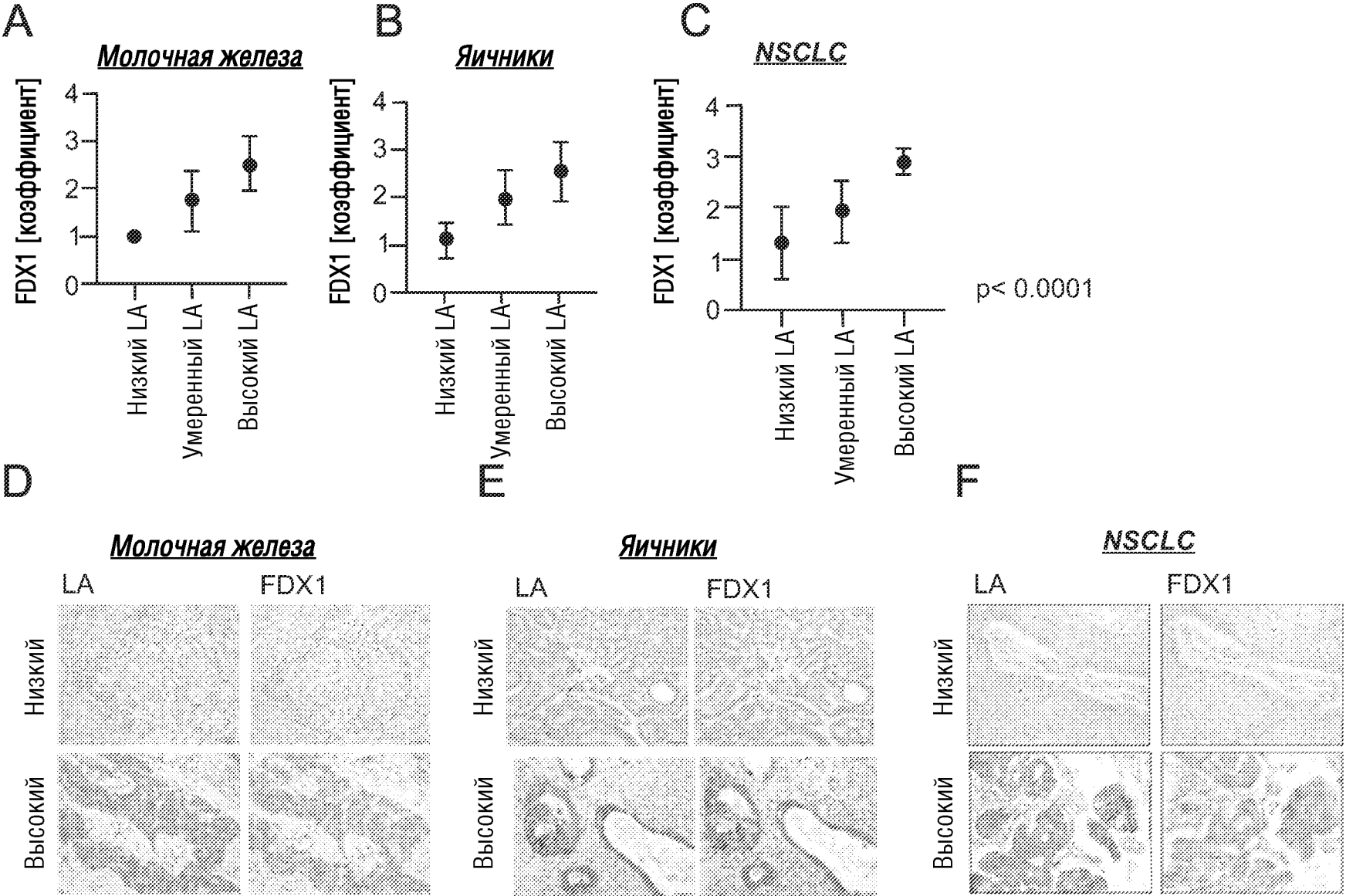


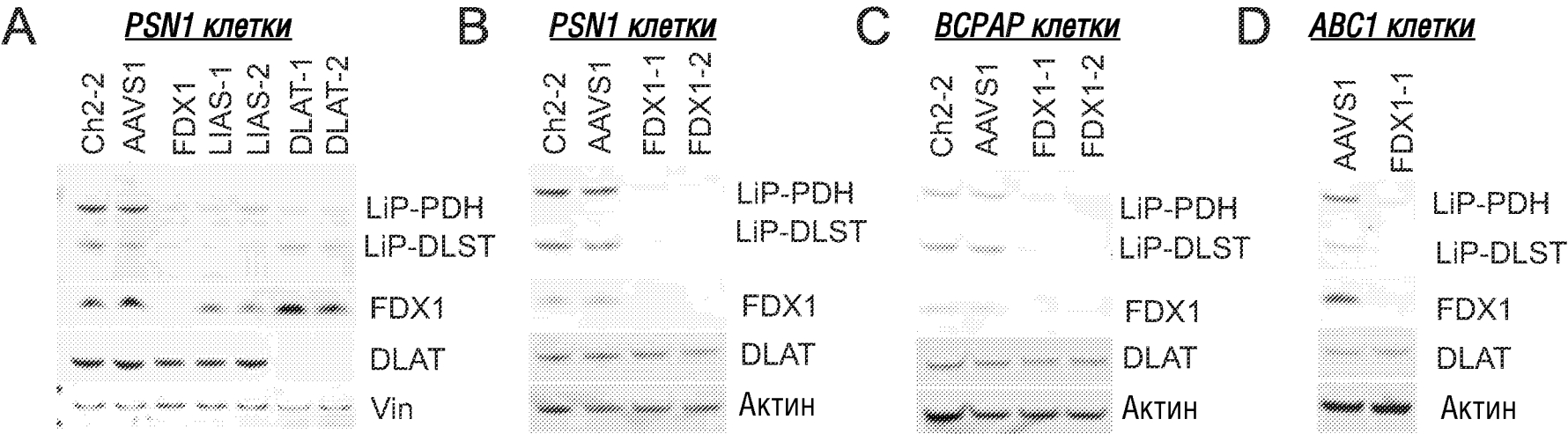
ФИГ.51

Предложенная стратегия скрининга для выявления соединений, индуцирующих оптимальный купрозот:



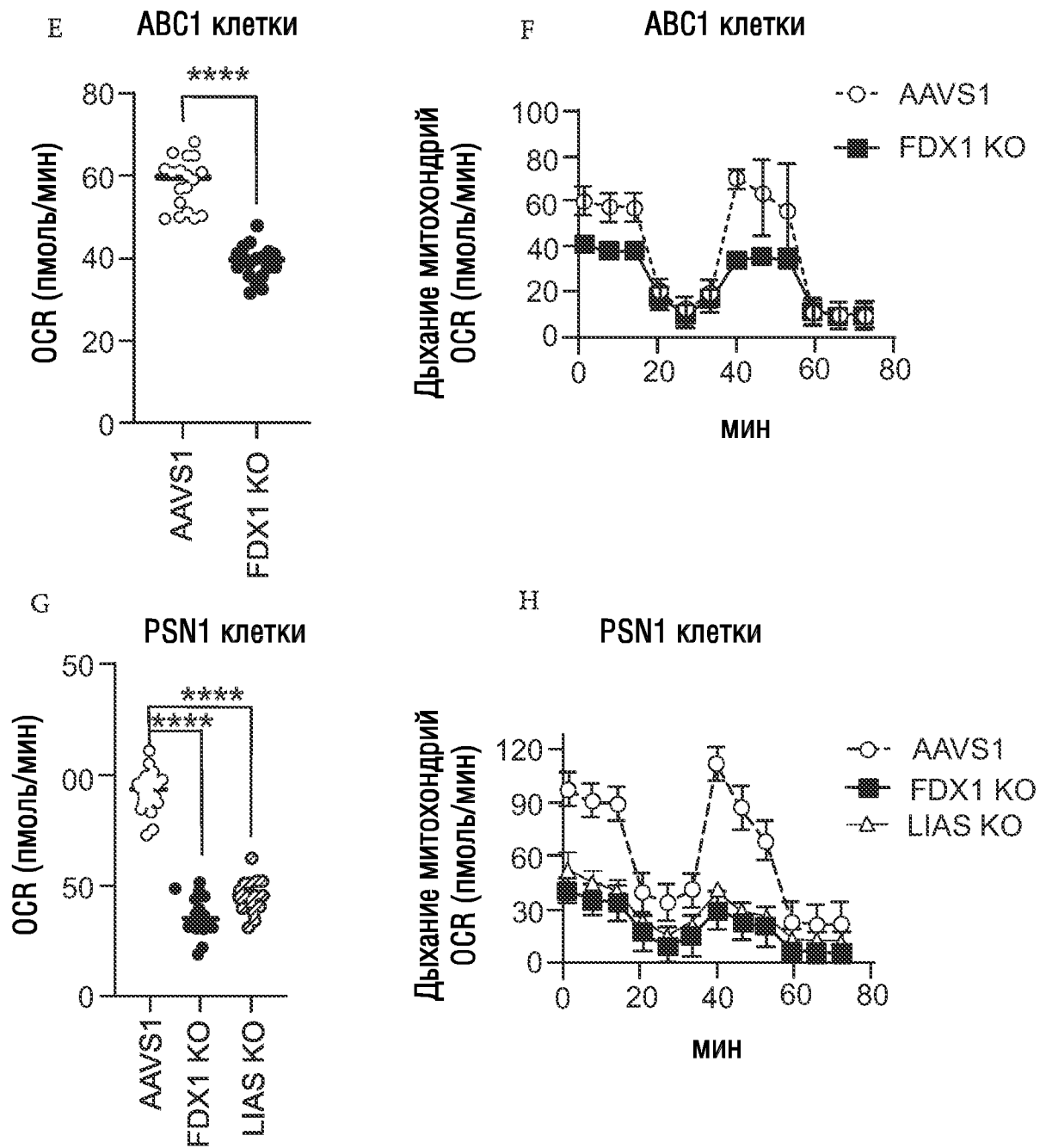
ФИГ.52



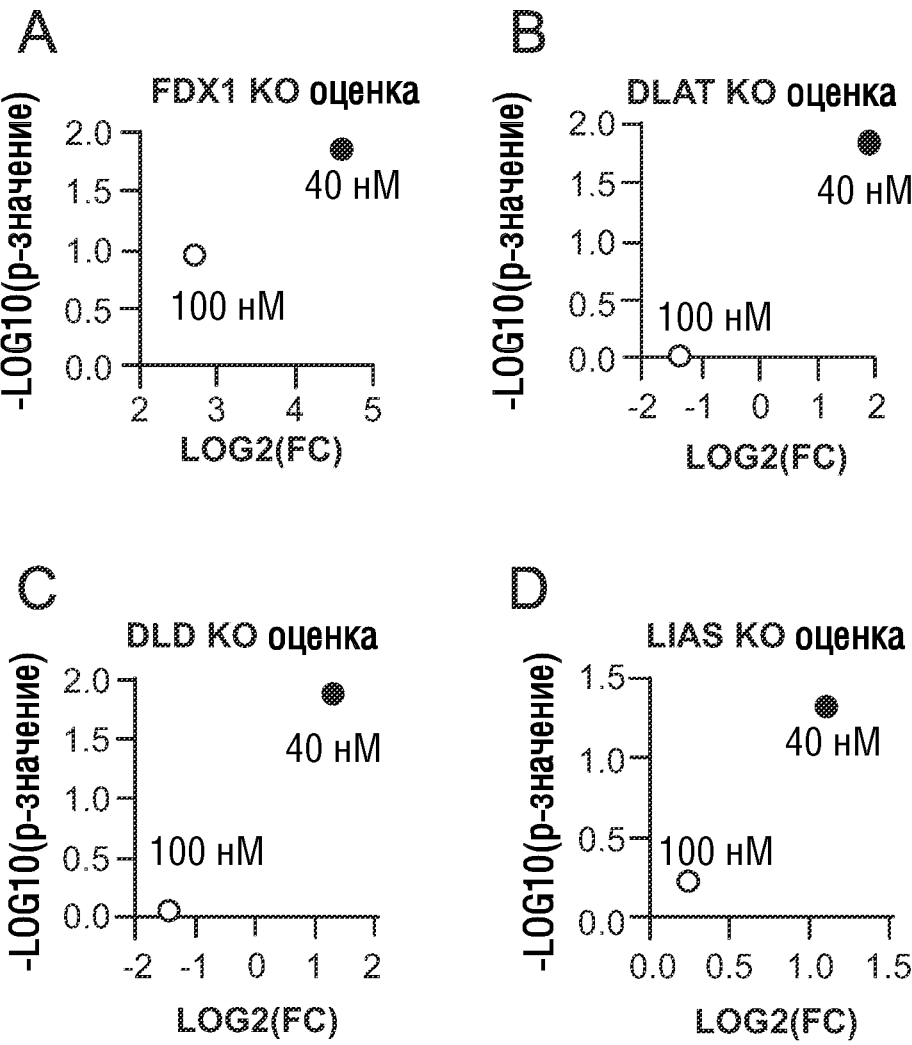


ФИГ.53, продолжение

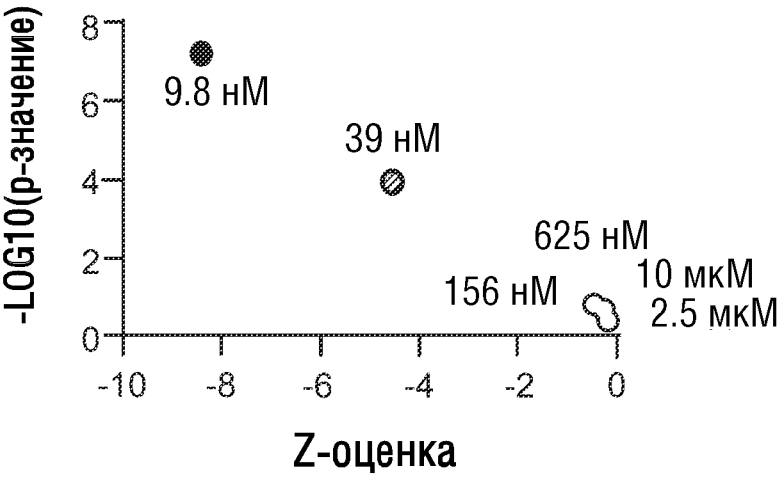
FDX1 KO ингибирует дыхание митохондрий

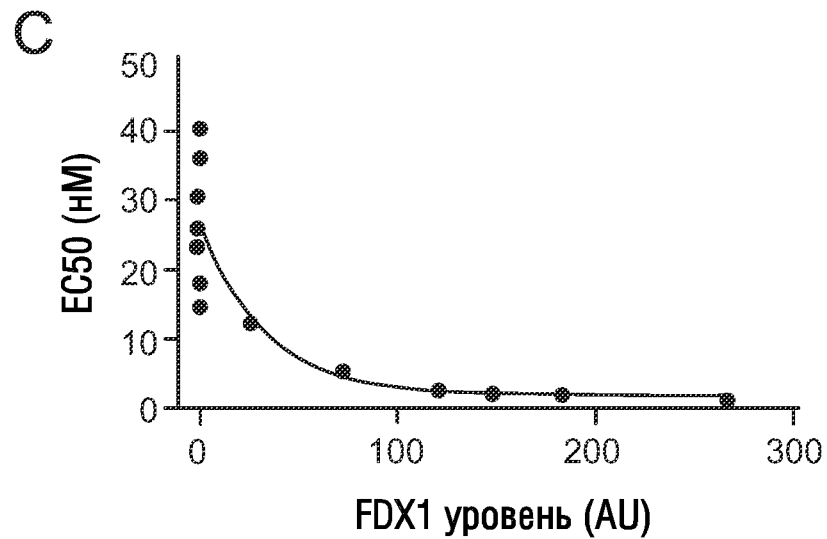
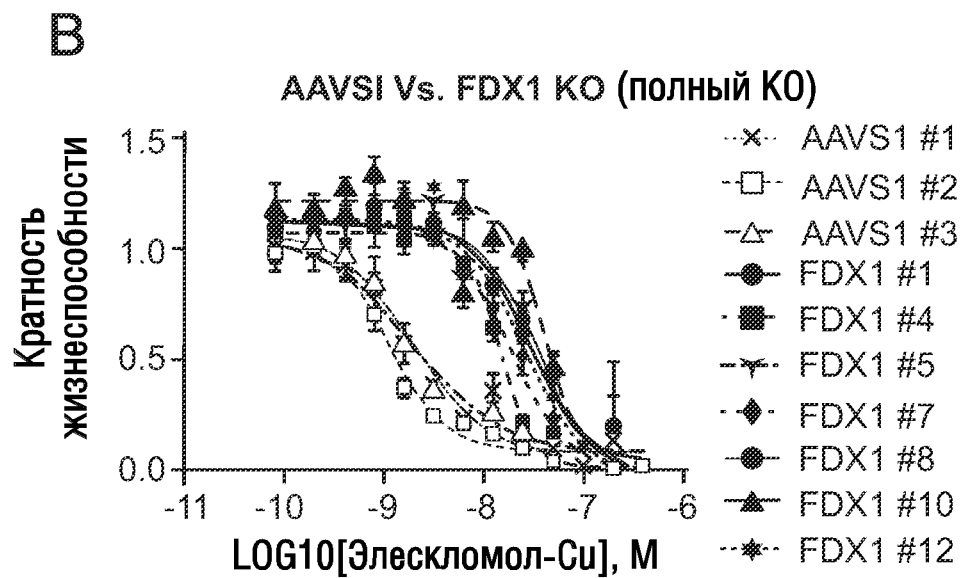
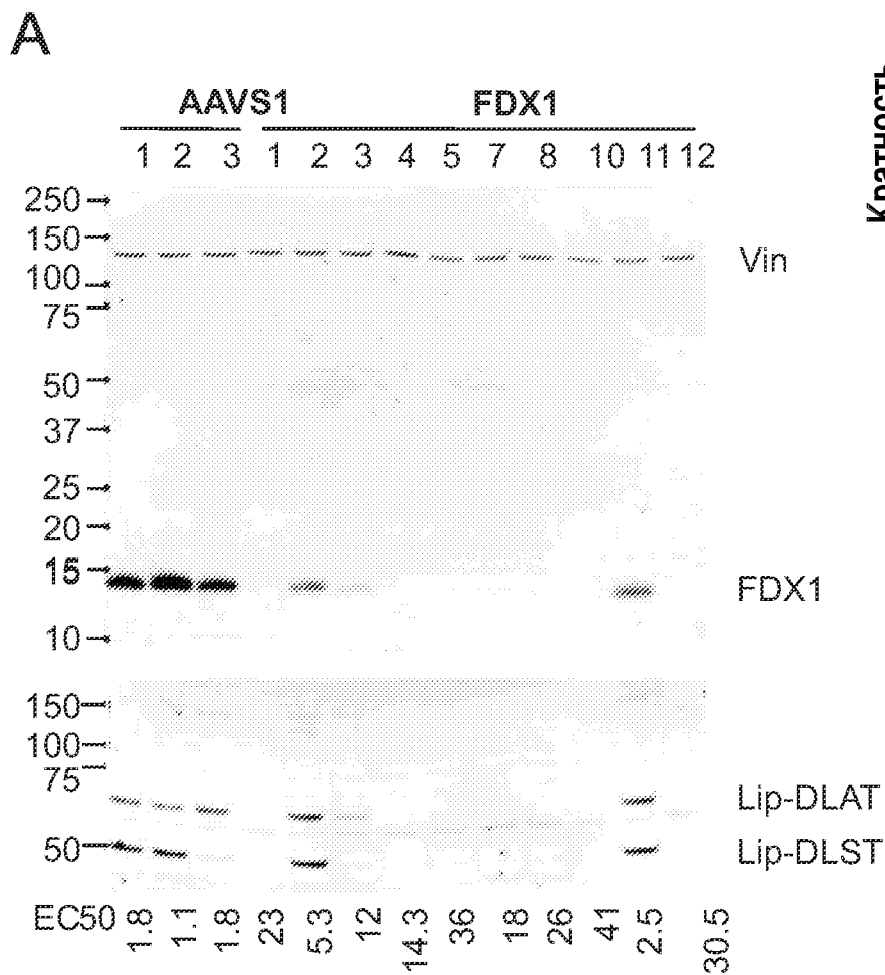


ФИГ.54

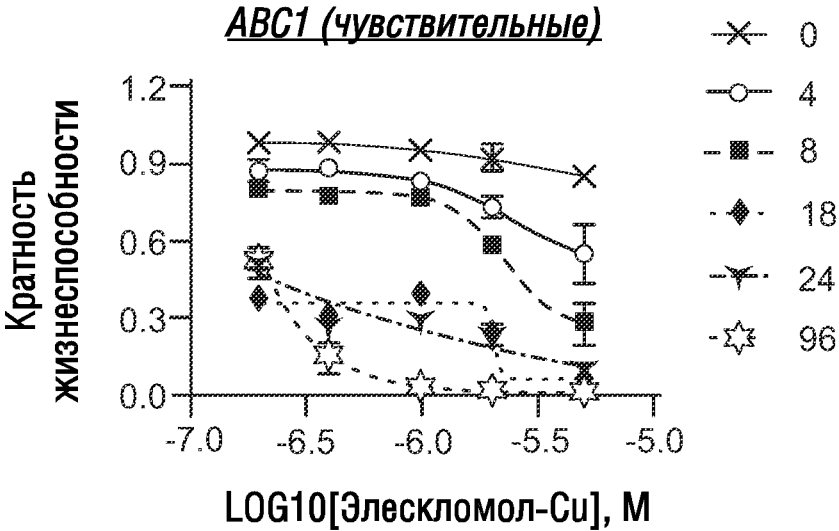
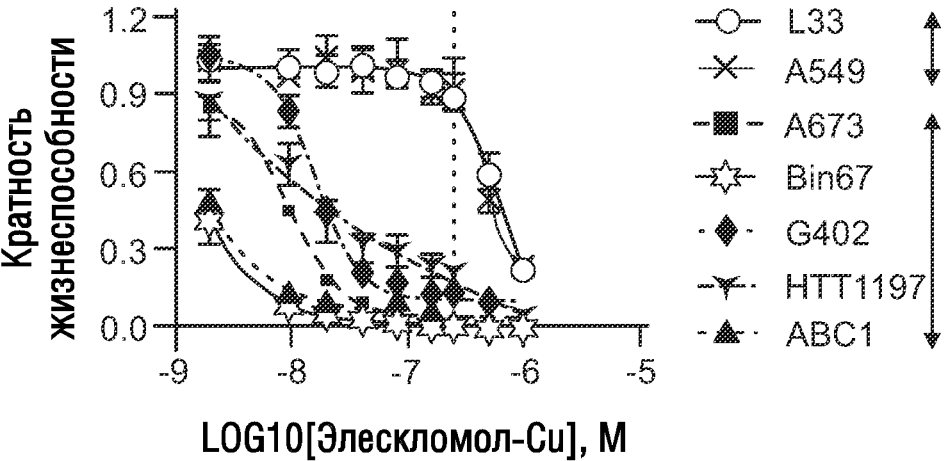
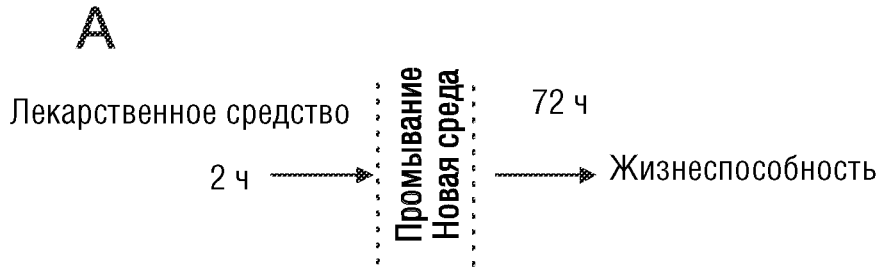


E FDX1 мРНК в качестве прогностического биомаркера (концентрации элескломола в PRISM)





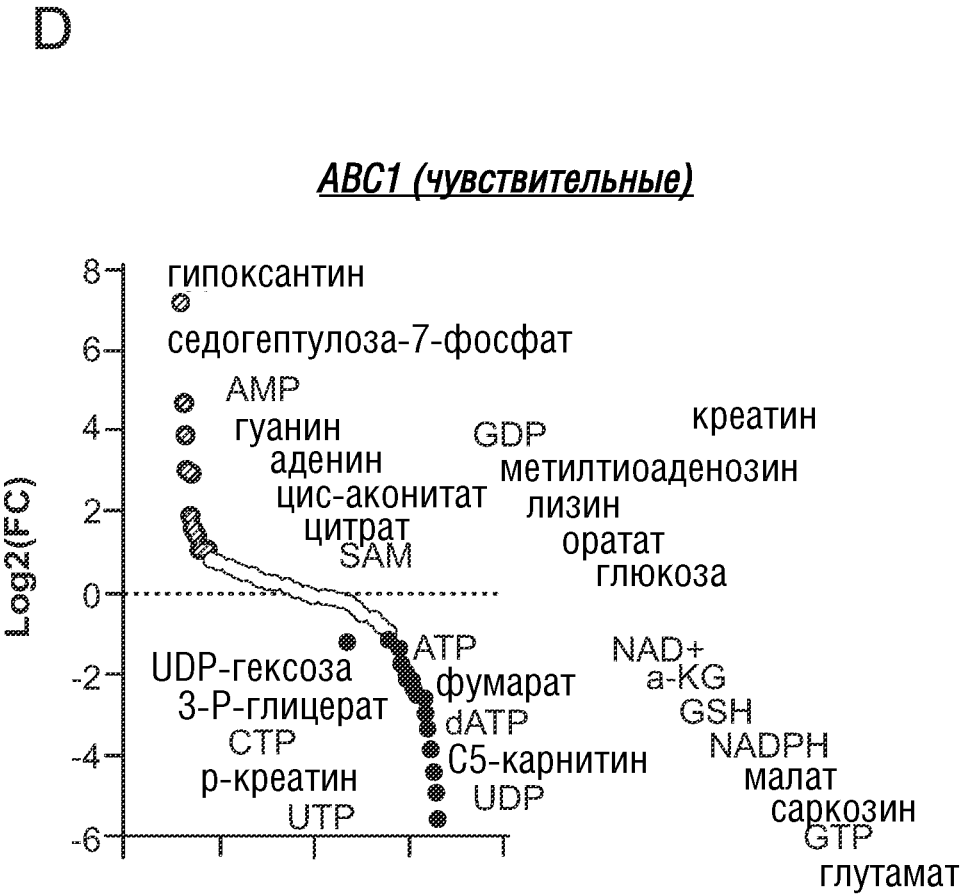
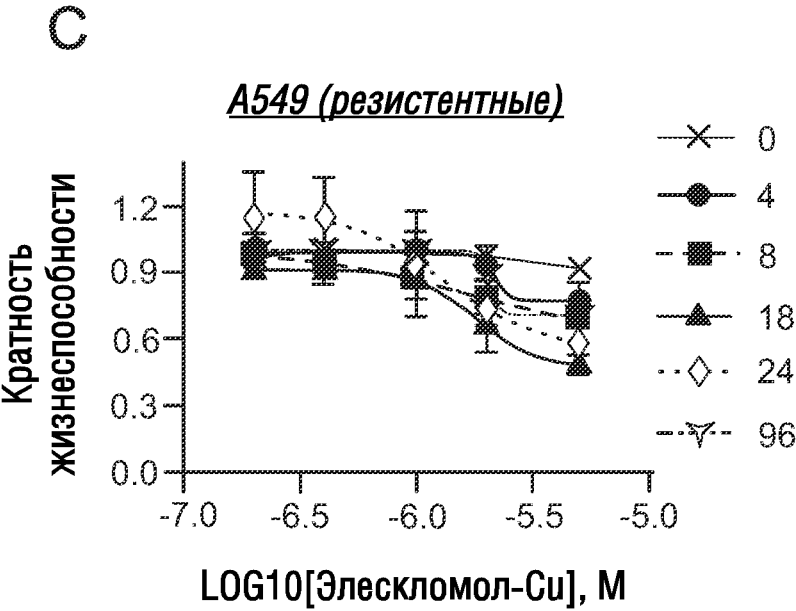
В



Отрицательный
по биомаркеру

Положительный
по биомаркеру

ФИГ.56, продолжение



ФИГ.56, продолжение

