

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390973** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.10

(22) Дата подачи заявки
2021.10.07

(51) Int. Cl. *A61K 31/282* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **63/089,195**

(32) **2020.10.08**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2021/077703**

(87) **WO 2022/074124 2022.04.14**

(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Лео Элизабетта (GB)

(74) Представитель:
**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)**

(57) Изобретение относится в целом к терапевтическим комбинациям, а также к соответствующим способам лечения, фармацевтическим композициям и наборам.

202390973
A1

202390973

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Уровень техники

Хотя в лечении рака был достигнут значительный прогресс, пациенты по-прежнему нуждаются в новых и эффективных видах терапии.

Сущность изобретения

AZD5305 (5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид) представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, которое действует посредством селективного ингибирования и улавливания PARP1 в местах одноцепочечных разрывов ДНК (SSB). Это как препятствует репарации ДНК, так и в ходе репликации ДНК приводит к образованию более пагубных двухцепочечных разрывов ДНК (DSB), когда аппарат репликации ДНК сталкивается с нековалентными комплексами PARP1-ДНК. В условиях, когда эффективными являются пути точной репарации ДНК, как, например, в клетках с высококачественной репарацией путем гомологичной рекомбинации (HRR), происходит точная репарация DSB. В отличие от этого, в клетках с дефектами путей репарации, таких как клетки с пагубными мутациями в генах BRCA, обработка с помощью AZD5305 приводит к избирательному накоплению нестабильности генома, что в конечном счете приводит к избирательному уничтожению раковых клеток, щадя нормальные клетки.

Химиотерапевтические средства на основе платины представляют собой лекарственные средства, применяемые для лечения рака, часто в схеме лечения первой линии. Примеры химиотерапевтических средств на основе платины включают цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку первого количества AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли и второго количества химиотерапевтического средства на основе платины или его фармацевтически приемлемой соли, где первое количество и второе количество вместе составляют терапевтически эффективное количество.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника, молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, гематологический рак, рак желудочно-кишечного тракта, как, например, рак желудка и колоректальный рак, или рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак с дефектом гомологичной рекомбинации (HRD). Например, то, является ли рак HRD-положительным,

можно определить с помощью анализа myChoice® HRD или myChoice® HRD Plus от Myriad Genetics.

В определенных вариантах осуществления раковые клетки содержат мутацию в гене HRD, выбранную из мутации гена *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*. В определенных вариантах осуществления раковые клетки содержат мутацию гена *BRCA1*, *BRCA2* и/или *ATM*. В определенных вариантах осуществления раковые клетки содержат мутацию гена *BRCA1* и/или *BRCA2*. Например, в определенных вариантах осуществления раковые клетки содержат мутацию гена *tBRCA*.

В определенных вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению рак характеризуется положительным статусом дефекта гомологичной рекомбинации (HRD), определяемым пагубной или предположительно пагубной мутацией *BRCA* и/или нестабильностью генома.

В определенных вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению рак представляет собой рак яичника или рак молочной железы. В определенных вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению рак представляет собой рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой эпителиальный рак яичника на поздней стадии. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой высокозлокачественный серозный рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой высокозлокачественный эндометриоидный рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой эпителиальный рак яичника, характеризующийся мутацией *gBRCA1* или *gBRCA2*. В определенных вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению рак представляет собой рак фаллопиевой трубы. В определенных вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению рак представляет собой первичный перитонеальный рак.

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника (как, например, эпителиальный рак яичника на поздней стадии), рак фаллопиевой трубы или первичный перитонеальный рак.

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника (как, например, эпителиальный рак яичника на поздней стадии), рак фаллопиевой трубы или первичный перитонеальный рак, при этом рак характеризуется положительным статусом дефекта гомологичной рекомбинации (HRD), определяемым пагубной или предположительно пагубной мутацией *BRCA* и/или нестабильностью генома.

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак является резистентным к препаратам платины.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий первую фармацевтическую композицию, содержащую AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель; и вторую фармацевтическую композицию, содержащую химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемую соль, и инструкции по применению.

Краткое описание графических материалов

Фигура 1 иллюстрирует изменение массы тела мышей в модели PDX (HBCx-9), в которой предоставлялось лечение с помощью AZD5305 в качестве монотерапии, карбоплатина в качестве монотерапии и в комбинации.

Фигура 2 иллюстрирует противоопухолевую активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели PDX (HBCx-9).

Фигура 3 иллюстрирует противоопухолевую активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели PDX (HBCx-9). Показаны данные по отдельным животным.

На **фигуре 4** показана рентгеновская порошковая дифракция формы А AZD5305.

Фигура 5 иллюстрирует изменение массы тела мышей в ксенотрансплантатной модели (SUM149PT), в которой предоставлялось лечение с помощью AZD5305 в качестве монотерапии, карбоплатина в качестве монотерапии и в комбинации.

Фигура 6 иллюстрирует противоопухолевую активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в ксенотрансплантатной модели (SUM149PT).

Фигура 7 иллюстрирует изменение массы тела мышей в модели PDX (HBCx-9), в которой предоставлялось лечение с помощью AZD5305 в качестве монотерапии, карбоплатина в качестве монотерапии и в комбинации.

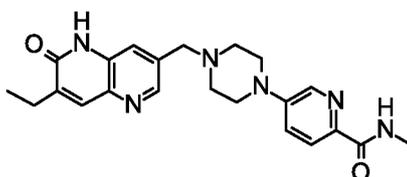
Фигура 8 иллюстрирует противоопухолевую активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели PDX (HBCx-9).

Фигура 9 иллюстрирует противоопухолевую активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином после прекращения лечения в модели PDX (HBCx-9), в которой предоставлялось лечение с помощью AZD5305 в качестве монотерапии, карбоплатина в качестве монотерапии и в комбинации.

Подробное описание

В некоторых вариантах осуществления раскрыт способ лечения рака с помощью комбинированной терапии, предусматривающей AZD5305 и химиотерапевтическое средство на основе платины. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту первого количества AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли и второго количества химиотерапевтического средства на основе платины или его фармацевтически приемлемой соли, где первое количество и второе количество вместе составляют терапевтически эффективное количество. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство на основе платины включает в себя любой из карбоплатина, цисплатина и оксалиплатина. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство на основе платины включает в себя карбоплатин. В одном варианте осуществления химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемая соль вводятся первыми, а AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль вводятся вторыми. В одном варианте осуществления AZD5305 или фармацевтически приемлемая соль вводятся первыми, а химиотерапевтическое средство на основе платины или фармацевтически приемлемая соль вводятся вторыми.

Термин "AZD5305" относится к соединению с химическим названием 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид и структурой, показанной ниже:



Получение AZD5305 раскрыто в данном документе (см. пример 1). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят AZD5305 в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят фармацевтически приемлемую соль AZD5305. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кристаллический AZD5305. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кристаллическую форму А AZD5305.

Термин "платиносодержащее химиотерапевтическое средство" включает лекарственные средства, содержащие металл платину, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль и химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемая соль вводятся отдельно, последовательно или одновременно. В одном варианте осуществления химиотерапевтическое средство на основе платины или его

фармацевтически приемлемая соль вводятся первыми, а AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль вводятся вторыми. В одном варианте осуществления AZD5305 или фармацевтически приемлемая соль вводятся первыми, а химиотерапевтическое средство на основе платины или фармацевтически приемлемая соль вводятся вторыми.

В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль и химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемая соль вводятся раздельно, последовательно или одновременно в цикле лечения.

Используемый в данном документе термин "цикл", "цикл лечения" или "схема введения доз" относится к периоду комбинированного лечения, который повторяют на регулярной основе. Например, лечение могут осуществлять в течение одной недели, двух недель или трех недель, где AZD5305 и химиотерапевтическое средство на основе платины вводят согласованно. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 3 месяцев. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения составляет от приблизительно 5 дней до приблизительно 1 месяца. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения составляет от приблизительно 1 недели до приблизительно 3 недель. В некоторых вариантах осуществления цикл лечения составляет приблизительно 1 неделю, приблизительно 10 дней, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 2 месяца или приблизительно 3 месяца.

В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль и химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту-человеку в течение одного или нескольких циклов лечения, например, курса лечения. Термин "курс лечения" включает несколько циклов лечения, которые можно повторять на регулярной основе или которые могут быть скорректированы в виде схемы с постепенным снижением дозы по мере мониторинга прогрессирования заболевания у пациента. Например, циклы лечения пациента могут включать более длинные периоды лечения и/или более короткие периоды отдыха в начале курса лечения (например, когда пациенту был впервые поставлен диагноз), и по мере того, как достигается ремиссия рака, период отдыха удлиняется, за счет чего увеличивается продолжительность одного цикла лечения. Период времени для лечения и отдыха в цикле лечения, число циклов лечения и продолжительность курса лечения могут определяться и корректироваться на протяжении курса лечения специалистом в данной области, исходя из прогрессирования заболевания у пациента, переносимости лечения и прогноза. В некоторых вариантах осуществления способ включает от 1 до 10 циклов лечения. В некоторых вариантах осуществления способ включает от 2 до 8 циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль представлены в капсулированной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль представлены в таблетированной лекарственной форме.

Выражения "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" включают снижение или ингибирование активности фермента или белка, связанного с PARP или раком, у субъекта, уменьшение тяжести одного или нескольких симптомов рака у субъекта или замедление или задержку прогрессирования рака у субъекта. Выражения "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" также включают снижение или ингибирование роста опухоли или пролиферации раковых клеток у субъекта.

Выражения "ингибировать", "ингибирование" или "осуществление ингибирования" включают снижение биологической активности или процесса по сравнению с их активностью на исходном уровне.

Термин "рак" включает без ограничения заболевание, вызываемое неконтролируемым делением аномальных клеток в части тела. В некоторых вариантах осуществления рак включает виды рака, которые являются восприимчивыми к лечению ингибиторами PARP (например, AZD5305). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника, рак молочной железы, рак поджелудочной железы и рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематологический рак, рак желудочно-кишечного тракта, как, например, рак желудка и колоректальный рак, или рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий или рефрактерный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, резистентный к препаратам платины.

Выражение "фармацевтическая композиция" включает композиции, содержащие активный ингредиент и фармацевтически приемлемые наполнитель, носитель или разбавитель, где активный ингредиент представляет собой AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль или химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемую соль.

В настоящем описании, если не указано иное, используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к таким соединениям, материалам, композициям, солям и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Выражение "фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель" включает соединения, материалы, композиции и/или лекарственные формы, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без избыточных токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, установленных специалистом в данной области. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представлены в твердых лекарственных формах, таких как капсулы, таблетки, гранулы, порошки, саше и т. д. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представлены в форме стерильного раствора для инъекций в одной или нескольких водных или неводных нетоксичных приемлемых для парентерального введения буферных системах, разбавителях, солубилизирующих средствах, сорастворителях или носителях. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильную инъекционную водную или масляную суспензию или суспензию в неводном разбавителе, носителе или сорастворителе, которая может быть составлена согласно известным процедурам с применением одного или нескольких соответствующих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Фармацевтические композиции могут представлять собой раствор для ив болюсного/инфузионного введения или лиофилизированную систему (отдельно либо со вспомогательными веществами) для разбавления буферной системой с другими вспомогательными веществами или без них. Лиофилизированный высушенный сублимацией материал может быть получен из неводных растворителей или водных растворителей. Лекарственная форма также может представлять собой концентрат для дальнейшего разбавления с последующей инфузией.

Термин "субъект" включает теплокровных млекопитающих, например, приматов, собак, кошек, кроликов, крыс и мышей. В некоторых вариантах осуществления субъект является приматом, например, человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком, таким как рак яичника, рак молочной железы, рак поджелудочной железы и рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком, таким как гематологический рак, рак желудочно-кишечного тракта, как, например, рак желудка и колоректальный рак, или рак легкого. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком яичника или раком молочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает рецидивирующим или рефрактерным раком яичника. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает рецидивирующим или рефрактерным раком молочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком и ранее не подвергался лечению (например, никогда не получал лечение от

рака). В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком и является резистентным к препаратам платины. Заболевание, резистентное к препаратам платины, определяется прогрессирующим в течение 6 месяцев, следующих за последним введением согласно схеме с использованием препаратов платины. Заболевание, рефрактерное к препаратам платины, определяется отсутствием по меньшей мере частичного ответа в ходе использования схем, включающих препараты платины. Схема с использованием препаратов платины включает лекарственные средства, которые содержат металл платину, такие как цисплатин и карбоплатин.

Выражение "терапевтически эффективное количество" включает такое количество AZD5305 и такое количество химиотерапевтического средства на основе платины, которые вместе будут вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта, например, снижение или ингибирование активности фермента или белка, связанного с PARP или раком; уменьшение тяжести симптомов рака или замедление или задержку прогрессирующего рака. В некоторых вариантах осуществления выражение "терапевтически эффективное количество" включает общее количество AZD5305 и химиотерапевтического средства на основе платины, которое является эффективным для по меньшей мере частичного облегчения, ингибирования и/или уменьшения тяжести рака, или ингибирования PARP, и/или снижения или ингибирования роста опухоли или пролиферации раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления выражение "терапевтически эффективное количество" включает общее количество AZD5305 и химиотерапевтического средства на основе платины, которое является эффективным для по меньшей мере частичного уменьшения или ингибирования роста опухоли или пролиферации раковых клеток у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления раскрыт набор, содержащий первую фармацевтическую композицию, содержащую AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель; и вторую фармацевтическую композицию, содержащую карбоплатин или его фармацевтически приемлемую соль; и инструкции по применению первой и второй фармацевтических композиций в комбинации. В некоторых вариантах осуществления первая фармацевтическая композиция содержит первое количество AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли, а вторая фармацевтическая композиция содержит второе количество химиотерапевтического средства на основе платины или его фармацевтически приемлемой соли; где первое количество и второе количество вместе составляют терапевтически эффективное количество.

Примеры

Комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, теперь будет дополнительно пояснена со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Пример 1

Получение AZD5305

Общие экспериментальные условия

Спектры ^1H -ЯМР получали с применением спектрометра Bruker для 300 МГц, 400 МГц или 500 МГц при 27°C, если не указано иное; химические сдвиги выражены в частях на миллион (ppm, δ -единицах) и относительно остаточного моно- ^1H -изотополога растворителя (CHCl_3 : 7,24 ppm; CH_2Cl_2 : 5,32 ppm; $\text{CD}_3\text{S(=O)CD}_2\text{H}$: 2,49 ppm). Константы взаимодействия приведены в герцах (Гц). Паттерны разделения описывают наблюдаемые мультиплетности и обозначены как s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), m (мультиплет) и br s (широкий синглет). LC-MS осуществляли с применением системы Waters для UPLC, оснащенной масс-спектрометром Waters SQD, или системы Shimadzu LC-20AD LC-20XR LC-30AD с масс-спектрометром Shimadzu 2020. Указанные молекулярные ионы соответствуют $[\text{M}+\text{H}]^+$, если не указано иное; для молекул с множественным изотопным распределением (Br, Cl и т. д.) указанное значение является значением, полученным для изотопа с наименьшей массой, если не указано иное.

Флэш-хроматографию проводили с применением прямофазной флэш-хроматографии на системе для очистки SP1TM от BiotageTM, CombiFlash[®]Rf от ISCO или на системе Gilson от Thermo Fisher с использованием картриджей с силикагелем в качестве нормальной фазы FLASH⁺TM (40 M, 25 M или 12 M) или SNAPTM KP-Sil (340, 100, 50 или 10), колонок Flash Silica-CS от Agela, с применением колонок для флэш-хроматографии C18 или стандартной флэш-хроматографии. В целом, все используемые растворители были коммерчески доступными и аналитической степени чистоты. Для осуществления реакций обычно применяли безводные растворители. Фазовые сепараторы, используемые в примерах, представляют собой колонки для фазового разделения ISOLUTE[®]. Промежуточные соединения и примеры, названные ниже, были названы с использованием ACD/Name 12.01 от Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs). Исходные материалы получали из коммерческих источников или изготавливали посредством путей, указанных в источниках литературы.

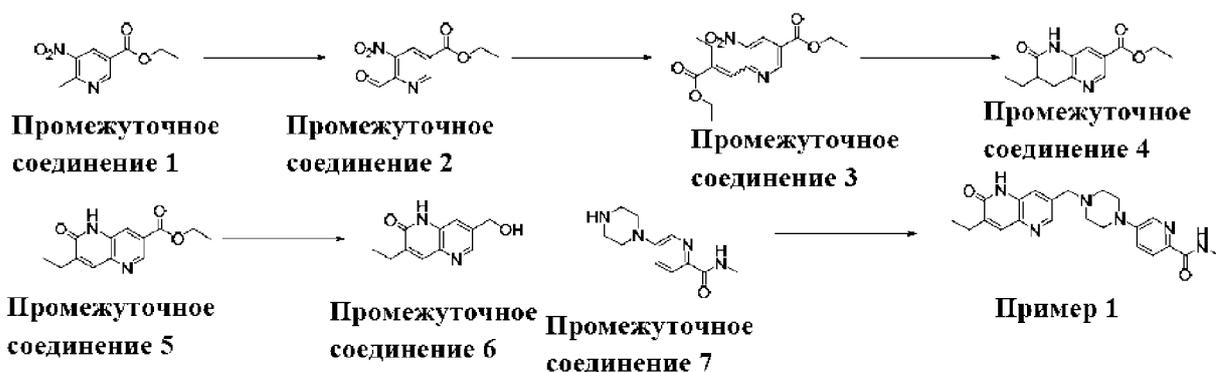
Анализ XRPD проводили с применением дифрактометра Bruker D8, который является коммерчески доступным от Bruker AXS IncTM (Мэдисон, Висконсин). Спектры XRPD получали путем установки образца (примерно 10 мг) материала для анализа на пластинчатый держатель из монокристалла кремния (например, кремниевый держатель образцов для рентгеновской дифракции с нулевым фоновым значением от Bruker) и

распределения образца в виде тонкого слоя с помощью предметного стекла. Образец вращали со скоростью 30 оборотов в минуту (для улучшения статистики подсчета) и облучали рентгеновским излучением, генерируемым медной длинной острофокусной трубкой, эксплуатируемой при 40 кВ и 40 мА с длиной волны 1,5406 ангстрема (т. е. приблизительно 1,54 ангстрема). Образец экспонировали в течение 1 секунды с шагом в 0,02 градуса угла 2-тета (режим непрерывного сканирования) в диапазоне от 5 градусов до 40 градусов угла 2-тета в режиме тета-тета. Время прогона составляло ~15 мин. для D8.

Значения угла 2θ XRPD могут изменяться в приемлемом диапазоне, например, в диапазоне $\pm 0,2^\circ$, и такие значения интенсивности XRPD могут изменяться при измерении по сути той же кристаллической формы по целому ряду причин, в том числе, например, предпочтительной ориентации. Принципы XRPD описаны в публикациях, таких как, например, Giacovazzo, C. et al. (1995), *Fundamentals of Crystallography*, Oxford University Press; Jenkins, R. and Snyder, R. L. (1996), *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*, John Wiley & Sons, New York; и Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), *X-ray Diffraction Procedures*, John Wiley and Sons, New York.

Используются следующие сокращения: водн. = водный; CH_2Cl_2 = дихлорметан; DCM = дихлорметан; DDQ = 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон; DIPEA = *N,N*-диизопропилэтиламин; DMSO = диметилсульфоксид; DMSO-d_6 = дейтерированный диметилсульфоксид; ESI = ионизация электрораспылением; MeCN или CH_3CN = ацетонитрил; ЯМР = ядерный магнитный резонанс; Pd/C = палладий на угле; TFA = трифторуксусная кислота; THF = тетрагидрофуран; TLC = тонкослойная хроматография; HCl = хлористоводородная кислота; HBr = бромистоводородная кислота; Cs_2CO_3 = карбонат цезия; MgSO_4 = сульфат магния; NaHCO_3 = бикарбонат натрия; SOCl_2 = тионилхлорид; NH_4Cl = хлорид аммония; Na_2SO_4 = сульфат натрия; H_2 = газ водород.

Химический синтез



Промежуточное соединение 2. Этил-6-формил-5-нитротиридин-3-карбоксилат

Смесь этил-6-метил-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 1**, 10 г, 47,58 ммоль) и диоксида селена (7,92 г, 71,36 ммоль) в 1,4-диоксане (50 мл) перемешивали при 110°C в течение 20 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через прокладку из целита, и целит промывали этилацетатом. Объединенный фильтрат концентрировали, и полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с градиентом элюирования 0–70% этилацетата в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением этил-6-формил-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 2**, 9,70 г, 91%) в виде коричневого масла. ¹H-ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) 1,48 (3H, t), 4,54 (2H, q), 8,81 (1H, d), 9,51 (1H, d), 10,32 (1H, s); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 224.

Промежуточное соединение 3. Этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилат (смесь E/Z-изомеров)

К перемешиваемому раствору гидрида натрия (9,63 г, 240,89 ммоль) (60% в минеральном масле) в безводном THF (100 мл) с помощью капельной воронки добавляли по каплям этил-2-(диэтоксифосфорил)бутаноат (60,8 г, 240,89 ммоль) при 0°C с получением смеси серого цвета. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин., и нагревали до комнатной температуры в течение 10 минут, и перемешивали при 40°C в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали до -78°C, и затем к данной охлажденной реакционной смеси медленно добавляли раствор этил-6-формил-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 2**, 22,5 г, 100,37 ммоль) в 100 мл THF. Смесь гасили насыщ. раствором NH₄Cl, экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с градиентом элюирования 0–50% этилацетата в гексанах. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 3**, 24,30 г, 75%) в виде желтого масла (смесь 1:1 E/Z-изомеров). ¹H-ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) 1,13 (3H, t), 1,18 (3H, t), 1,23 (3H, t), 1,37 (3H, t), 1,45 (6H, q), 2,57 (2H, qd), 2,66 (2H, q), 4,11 - 4,24 (2H, m), 4,32 (2H, q), 4,45 - 4,56 (4H, m), 7,08 (1H, s), 7,85 (1H, s), 8,86 (2H, dd), 9,26 (1H, d), 9,43 (1H, d); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 322.

Промежуточное соединение 4. Этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат

Смесь этил-6-[(E)-2-этоксикарбонилбут-1-енил]-5-нитропиридин-3-карбоксилата (смесь 1:1 E/Z-изомеров) (**промежуточного соединения 3**, 3,75 г, 11,63 ммоль), Pd/C (1,857 г,

1,75 ммоль) (10%) в этаноле (30 мл) дегазировали, заполняли с помощью H₂ (из баллона), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в атмосфере H₂. Смесь фильтровали через слой целита, и слой целита промывали этанолом. После концентрирования к полученному остатку добавляли 4 М HCl в диоксанах (15 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь разбавляли эфиром, и твердое вещество отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и высушивали под вакуумом с получением этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 4**, 2,260 г, 78%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 0,94 (3H, t), 1,33 (3H, t), 1,41 - 1,51 (1H, m), 1,69 - 1,81 (1H, m), 2,41 - 2,48 (1H, m), 2,94 (1H, dd), 3,20 (1H, dd), 4,35 (2H, t), 7,67 (1H, d), 8,61 (1H, d), 10,32 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 249.

Промежуточное соединение 5. Этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат

Этил-7-этил-6-оксо-7,8-дигидро-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилат (**промежуточное соединение 4**, 2,26 г, 9,10 ммоль) растворяли в 1,4-диоксане (40 мл), добавляли DDQ (2,273 г, 10,01 ммоль), и смесь перемешивали с обратным холодильником в течение 3 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, добавляли насыщ. раствор NaHCO₃, и остаток перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Твердое вещество отфильтровывали, промывали водой, а затем с помощью 10 мл диэтилового эфира. Полученное твердое вещество высушивали под вакуумом с получением этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилата (**промежуточного соединения 5**, 1,738 г, 78%) в виде светло-коричневого твердого вещества.

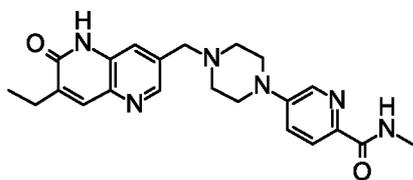
¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) 1,14 - 1,28 (3H, m), 1,35 (3H, t), 2,58 (2H, q), 4,38 (2H, q), 7,83 (1H, s), 8,17 (1H, s), 8,90 (1H, s), 12,05 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 247.

Промежуточное соединение 6. 3-Этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,5-нафтиридин-2-он

Алюмогидрид лития, 2 М в THF (29,2 мл, 58,47 ммоль), по каплям добавляли к этил-7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-карбоксилату (**промежуточному соединению 5**, 7,2 г, 29,24 ммоль) в тетрагидрофуране (150 мл) при 0°C в течение периода 45 минут в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 часа. Реакционную смесь гасили путем добавления по каплям 1 М водн. HCl (29 мл). Реакционную смесь концентрировали, и твердое вещество разбавляли водой (~ 150 мл) и 29 мл 1М раствора HCl с получением желтой суспензии. Твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали водой, диэтиловым эфиром и высушивали с получением неочищенного продукта в виде желтого твердого вещества (загрязненного некоторым количеством неорганической соли). Данное твердое вещество суспендировали в смеси метанола и DCM (2:1) (400 мл) и нагревали с обратным холодильником. Твердое вещество отфильтровывали.

Данное твердое вещество ресуспендировали в смеси метанол/DCM, и данную процедуру повторяли 5 раз с извлечением большей части продукта из данной смеси. Затем объединенный фильтрат концентрировали до приблизительно 100 мл, и твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали эфиром, высушивали под вакуумом с получением 3-этил-7-(гидроксиметил)-1H-1,5-нафтиридин-2-она (**промежуточного соединения 6**, 4,35 г, 72,8%) в виде желтого твердого вещества. 1H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d6) 1,18 (3H, t), 2,52 - 2,56 (2H, m), 4,61 (2H, d), 5,44 (1H, t), 7,61 (1H, s), 7,74 (1H, s), 8,37 (1H, s), 11,87 (1H, br s); m/z (ES+) [M+H]⁺ = 205,3.

Пример 1. 5-[4-[(7-Этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид



Тионилхлорид (6,41 мл, 88,14 ммоль) по каплям добавляли к суспензии 3-этил-7-(гидроксиметил)-1,5-нафтиридин-2(1H)-она (**промежуточного соединения 6**, 3 г, 14,69 ммоль) и N,N-диметилформамида (0,114 мл, 1,47 ммоль) в CH₂Cl₂ (60 мл) при 0°C, и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Смесь концентрировали досуха с получением неочищенного 7-(хлорметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она.

DIPEA (12,83 мл, 73,45 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору 7-(хлорметил)-3-этил-1H-1,5-нафтиридин-2-она (неочищенного, как указано выше), йодида калия (0,488 г, 2,94 ммоль) и N-метил-5-пиперазин-1-илпиридин-2-карбоксамид, 2HCl (**промежуточного соединения 7**, 4,31 г, 14,69 ммоль) в ацетонитриле (50,00 мл) при 20°C. Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом. Неочищенный материал разбавляли водой, подщелачивали с помощью водн. раствора NaHCO₃ и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта. Полученный остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле с градиентом элюирования 0–15% MeOH в DCM. Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5H-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (**примера 1**, 3,93 г, 65,8%) в виде грязно-белого частично кристаллического твердого вещества. 1H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d6) 1,19 (3H, t), 2,53 - 2,59 (6H, m), 2,79 (3H, d), 3,33 - 3,39 (4H, m), 3,66 (2H, s), 7,39 (1H, dd), 7,64 (1H, s),

7,76 (1H, s), 7,83 (1H, d), 8,27 (1H, d), 8,36 - 8,40 (1H, m), 8,41 (1H, d), 11,85 (1H, s); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 406.

Пример 1 – форма А

В примере 1 5-[4-[(7-этил-6-оксо-5Н-1,5-нафтиридин-3-ил)метил]пиперазин-1-ил]-N-метилпиридин-2-карбоксамид получали в виде частично кристаллического твердого вещества посредством выпаривания раствора метанола/дихлорметана при пониженном давлении. Кристаллический материал, полученный таким образом, характеризовали как кристаллическую форму А.

В случае низкой степени кристалличности кристаллическую форму А можно было получить посредством суспендирования 20 мг неочищенного образца в 0,20 мл воды, метанола, этанола, ацетона, ацетонитрила, тетрагидрофурана, этилацетата или другого растворителя в течение 1 дня при температуре окружающей среды или 50°C.

Форму А анализировали посредством XRPD, и результаты приведены в виде таблицы ниже (таблица 1) и показаны на **фиг. 4**.

Таблица 1. Пики XRPD для формы А

Угол ($2\theta \pm 0,2^\circ$)	Интенсивность (%)
8,3	100,0
12,4	30,9
19,4	26,5
20,4	25,8
26,3	19,2
21,2	17,4
20,8	14,8
22,8	14,1
16,8	14,0
10,2	13,2
18,4	10,8
11,4	9,9
28,1	8,4
18,0	8,4
25,2	8,2
24,9	6,7
16,5	6,4
17,3	5,3
22,1	4,0
29,3	3,3
24,3	2,7
30,3	2,5
38,2	2,0

33,9	1,4
14,2	1,4
13,7	1,4
33,0	1,3
36,5	1,2
39,2	1,2

Форма А характеризуется тем, что обеспечивает по меньшей мере одно из следующих значений угла 2θ , измеренных с применением $\text{CuK}\alpha$ -излучения: 8,3, 12,4 и 19,4°.

Пример 2

Данное исследование *in vivo* проводили для изучения противоопухолевых эффектов AZD5305 в комбинации с карбоплатином (химиотерапевтическим средством на основе платины) в модели опухоли с BRCA дикого типа HBCx-9 *in vivo*. Группы монотерапии AZD5305 и монотерапии карбоплатином были включены в план исследования в качестве контролей.

Материалы и способы

Сокращения

Сокращение или специальный термин	Пояснение
1 н.	1-молярный
BRCA	Белок восприимчивости к раку молочной железы
BRCAm	Мутантный BRCA
CR	Полный ответ
HCl	Хлористоводородная кислота
HRD	Дефект пути гомологичной рекомбинации дезоксирибонуклеиновой кислоты
NaCl	Хлорид натрия
NaOH	Гидроксид натрия
PDX	Эксплантат опухоли, полученный от пациента
PO	Пероральный(перорально)
QD	Quaque die (один раз в день)
QD	Один раз в неделю
RB1	Ретинобластомный корепрессор 1 транскрипции
Reg	Регрессия
SC	Подкожно
SEM	Стандартная ошибка среднего значения
SLFN11	Представитель 11 семейства Schlafen
TGI	Ингибирование роста опухоли
TNBC	Трижды негативный рак молочной железы
TV	Объем опухоли
WT	Дикий тип

Живая фаза

НВСх-9 представляет собой модель эксплантата опухоли, полученного от пациента (PDX), созданную в XenTech без предварительного культивирования *in vitro*. Фрагменты опухолей пересаживали подкожно (SC) мышам-донорам. Когда объем опухолей достигал от 700 до 1764 мм³, мышей-доноров умерщвляли, а опухоли асептически вырезали и препарировали. После удаления некротических участков опухоли разрезали на фрагменты размером примерно 20 мм³ и переносили в культуральную среду перед пересадкой SC самкам бестимусных мышей-реципиентов (экспериментальных). Опухоли измеряли (длина × ширина) два раза в неделю путем измерений с помощью двустороннего штангенциркуля с нониусом, и объем опухоли рассчитывали по формуле эллипса ($\pi/6 \times \text{ширина} \times \text{ширина} \times \text{длина}$). Массу тела животных и состояние опухоли отслеживали на всем протяжении исследования. Мышей рандомизировали в группы лечения, когда средний объем опухоли достигал примерно 100 мм³. Животные получали лечение, начиная со следующего дня после рандомизации. Контрольные животные получали лечение перорально (PO) один раз в день (QD) средой-носителем (деионизированная вода, подкисленная с помощью HCl до pH 3,5-4). AZD5305 вводили в дозе 1 мг/кг PO QD. Карбоплатин вводили в дозе 50 мг/кг внутривенно (IP) один раз в неделю (QW). В группе комбинированного лечения мышам вначале вводили дозу карбоплатина, а затем в течение 10 минут вводили AZD5305.

Ингибирование роста опухоли от начала лечения оценивали посредством сравнения среднего изменения объема опухоли в контрольных группах и группах лечения и представляли как процентное ингибирование роста (TGI, если TV \geq начальный TV) или регрессию опухоли (reg, если TV < начальный TV). Среднее процентное изменение массы тела от начала лечения также рассчитывали для всех групп. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего t-критерия. Статистическая значимость указана следующим образом: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Исследования переносимости с использованием AZD5305 в дозе 10 мг/кг PO QD в комбинации с карбоплатином в дозе 50 мг/кг IP QW проводились на самках мышей с SCID до начала исследования эффективности и не продемонстрировали нежелательных эффектов в отношении состояния животных или значительных изменений массы тела.

Составление тестируемых материалов

AZD5305 составляли для перорального введения доз в среде-носителе, представляющей собой воду с HCl при pH 3,5-4, для введения в объеме дозы 0,1 мл/10 г. Твердое вещество разбавляли, добавляя соответствующий объем 1 н. HCl до молярного соотношения лекарственное средство/HCl, составляющего приблизительно 1:1,25, и 80% конечного

объема стерильной деионизированной воды при перемешивании/вихревом перемешивании/обработке ультразвуком до получения раствора. Необходимый объем 1 н. HCl рассчитывали согласно следующему уравнению:

объем добавленной 1 н. HCl (мл) = $1,25 \times [\text{концентрация (мг/мл)} \div 406,48 \text{ (г/моль)} \div 1\text{M}]$
 \times конечный объем (мл)

pH раствора довели до 3,5-4 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Конечный объем составляли с использованием стерильной воды для инъекций или деионизированной воды, и конечный pH измеряли и записывали. Препараты для введения доз составляли один раз в неделю и защищали от света.

Карбоплатин (Teva®) составляли свежим в каждый день введения доз путем разбавления исходного раствора в 0,9% NaCl до 5 мг/мл для дозы 50 мг/кг (объем дозы 0,1 мл/10 г).

РЕЗУЛЬТАТЫ

НВСx-9 представляет собой модель PDX TNBC, доступную от XenTech, Франция. О ней сообщалось как о модели BRCA wt с метилированием BRCA1 [1]. Было также показано, что НВСx-9 обладает умеренной чувствительностью к монотерапии олапарибом [2].

AZD5305 в дозе 1, 0,1 и 0,01 мг/кг QD и карбоплатин в дозе 50 мг/кг QW тестировали в исследовании эффективности в качестве монотерапии и в комбинации. Период лечения длился 28 дней. Все виды лечения хорошо переносились в течение всей продолжительности исследования, и не наблюдалось значительной потери массы тела (фигуры 1 и 7). Монотерапия AZD5305 продемонстрировала дозозависимую противоопухолевую эффективность, обеспечивая 72% TGI, а в группе монотерапии карбоплатином наблюдалось 88% TGI. AZD5305 и карбоплатин, вводимые дозами совместно, продемонстрировали явное преимущество комбинации, обеспечивая 88% регрессию опухоли (фигура 2 и таблица 2). Более того, все животные в группе комбинированного лечения (8/8) достигли полного ответа (CR; определяется как TV < 14 мм³) (фигура 3).

В заключение, AZD5305 в комбинации с карбоплатином продемонстрировал улучшенный противоопухолевый эффект по сравнению с каждым средством монотерапии в модели PDX НВСx-9 *in vivo*. Комбинация AZD5305 и карбоплатина приводила к полному ответу у 100% животных и хорошо переносилась мышами.

Модель опухоли	Лечение	Доза и схема	Продолжительность введения доз (дни)	Ингибирование роста/регрессия опухоли (конец лечения) (p-значение согласно t-критерию по сравнению с контролем в виде среды-носителя)
НВСх-9	AZD5305	1 мг/кг QD	28	72% TGI *** ($p \leq 0,001$)
	Карбоплатин	50 мг/кг QW		88% TGI *** ($p \leq 0,001$)
	AZD5305 + карбоплатин	как указано выше		87% регрессия *** ($p \leq 0,001$)

Таблица 2. Противоопухолевые эффекты AZD5305, карбоплатина и комбинации обоих средств *in vivo* в модели эксплантата, полученного от пациента, НВСх-9.

[1] Coussy F, de Koning L, Lavigne M, et al. A large collection of integrated genomically characterized patient-derived xenografts highlighting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(7):1902-1912. doi:10.1002/ijc.32266

[2] LC Riches (2020) *Mol Cancer Ther* 2020;19:13–25

Пример 3

Данное исследование проводили для изучения противоопухолевых эффектов AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели опухоли с мутацией BRCA1 SUM149PT *in vivo*. Группы монотерапии AZD5305 и монотерапии карбоплатином были включены в план исследования в качестве контролей.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Клетки SUM149PT (2×10^6) имплантировали с 50% Matrigel в жировое тело молочной железы (MFP) самок мышей с SCID (массой более 18 г). Опухоли измеряли (длина x ширина) два раза в неделю путем измерений с помощью двустороннего штангенциркуля с нониусом, и объем опухоли рассчитывали по формуле эллипса ($\pi/6 \times \text{ширина} \times \text{ширина} \times \text{длина}$). Массу тела животных и состояние опухоли отслеживали на всем протяжении исследований. Мышей рандомизировали в группы лечения, когда средний объем опухоли достигал примерно $0,3 \text{ см}^3$. Животные получали лечение, начиная со следующего дня после рандомизации. Контрольные животные получали лечение перорально (PO) один раз в день (QD) средой-носителем (деионизированная вода, подкисленная с помощью HCl до pH 3,5-4) и внутривентриально (IP) один раз в неделю (QW) с помощью PBS. AZD5305 вводили в дозе 0,1, 0,03 или 0,01 мг/кг PO QD. Карбоплатин вводили в дозе 37,5 мг/кг IP один раз в неделю (QW). В группе комбинированного лечения мышам вначале вводили дозу карбоплатина, а затем в течение 10 минут вводили AZD5305.

Ингибирование роста опухоли от начала лечения оценивали посредством сравнения среднего изменения объема опухоли в контрольных группах и группах лечения и представляли как процентное ингибирование роста (TGI, если TV \geq начальный TV) или регрессию опухоли (reg, если TV < начальный TV). Среднее процентное изменение массы тела от начала лечения также рассчитывали для всех групп. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего t-критерия. Статистическая значимость указана следующим образом: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Исследования переносимости с использованием AZD5305 в дозе 10 мг/кг PO QD в комбинации с карбоплатином в дозе 50 мг/кг IP QW проводились на самках мышей с SCID до начала исследования эффективности и не продемонстрировали нежелательных эффектов в отношении состояния животных или значительных изменений массы тела.

Составление тестируемых материалов

AZD5305 составляли для перорального введения доз в среде-носителе, представляющей собой воду с HCl при pH 3,5-4, для введения в объеме дозы 0,1 мл/10 г. Твердое вещество разбавляли, добавляя соответствующий объем 1 н. HCl до молярного соотношения лекарственное средство/HCl, составляющего приблизительно 1:1,25, и 80% конечного объема стерильной деионизированной воды при перемешивании/вихревом перемешивании/обработке ультразвуком до получения раствора. Необходимый объем 1 н. HCl рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\text{объем добавленной 1 н. HCl (мл)} = 1,25 \times [\text{концентрация (мг/мл)} \div 406,48 \text{ (г/моль)} \div 1\text{M}] \times \text{конечный объем (мл)}$$

pH раствора доводили до 3,5-4 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Конечный объем составляли с использованием стерильной воды для инъекций или деионизированной воды, и конечный pH измеряли и записывали. Препараты для введения доз составляли один раз в неделю и защищали от света.

Карбоплатин (Sigma Aldrich) составляли свежим в каждый день введения доз путем разбавления исходного раствора в 0,9% NaCl до 3,75 мг/мл для дозы 37,5 мг/кг (объем дозы 0,1 мл/10 г).

РЕЗУЛЬТАТЫ

AZD5305 в дозе 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг QD и карбоплатин в дозе 37,5 мг/кг QW тестировали в исследовании эффективности в ксенотрансплантатной модели TNBC BRCA1m SUM149PT в качестве монотерапии и в комбинации. Все виды лечения хорошо переносились в течение всей продолжительности исследования (28 дней), и не наблюдалось значительной потери массы тела (фигура 5). Монотерапия AZD5305 продемонстрировала дозозависимую противоопухолевую эффективность, обеспечивая 24% TGI и 9% TGI в дозе

0,1 мг/кг QD и 0,03 мг/кг QD соответственно. AZD5305 в дозе 0,01 мг/кг QD не ингибировал рост опухоли. Монотерапия карбоплатином приводила к 61% TGI. Комбинация 0,1 мг/кг AZD5305 и карбоплатина продемонстрировала преимущество комбинации и обеспечивала 86% TGI. Этот противоопухолевый эффект сохранялся даже при снижении уровня дозы AZD5305 в комбинации с карбоплатином до 0,03 мг/кг или 0,01 мг/кг (75% TGI и 79% TGI соответственно) (фигура 6 и таблица 3).

В заключение, AZD5305 в комбинации с карбоплатином продемонстрировал улучшенный противоопухолевый эффект по сравнению с группами монотерапии в ксенотрансплантатной модели SUM149PT *in vivo*. Снижение уровня дозы AZD5305 в 10 раз (с 0,1 мг/кг до 0,01 мг/кг) в комбинации с карбоплатином не влияло на эффект ингибирования роста опухоли.

Таблица 3. Сводная информация о противоопухолевых эффектах AZD5305, карбоплатина и комбинации обоих средств *in vivo* в ксенотрансплантатной модели SUM149PT

Модель опухоли	Лечение	Доза и схема	Продолжительность введения доз (дни)	Ингибирование роста/регрессия опухоли (конец лечения) (p-значение согласно t-критерию по сравнению с контролем в виде среды-носителя)
SUM149PT	Карбоплатин	37,5 мг/кг QW	28	61% TGI *** ($p \leq 0,001$)
	AZD5305	0,1 мг/кг QD		24% TGI ** ($p \leq 0,01$)
	AZD5305	0,03 мг/кг QD		9% TGI (незначимо)
	AZD5305	0,01 мг/кг QD		Отсутствие TGI или регрессии
	Карбоплатин + AZD5305	37,5 мг/кг QD + 0,1 мг/кг QD		86% TGI *** ($p \leq 0,001$)
	Карбоплатин + AZD5305	37,5 мг/кг QD + 0,03 мг/кг QD		75% TGI *** ($p \leq 0,001$)
	Карбоплатин + AZD5305	37,5 мг/кг QD + 0,01 мг/кг QD		79% TGI *** ($p \leq 0,001$)

Пример 4

Данное исследование проводили для изучения противоопухолевых эффектов диапазона доз AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели опухоли с BRCA1/2 дикого типа HBCx-9 *in vivo*. Группы монотерапии AZD5305 и монотерапии карбоплатином были включены в план исследования в качестве контролей.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

НВСх-9 представляет собой модель эксплантата опухоли, полученного от пациента (PDX), созданную в XenTech без предварительного культивирования *in vitro*. Фрагменты опухолей пересаживали подкожно (SC) мышам-донорам. Когда объем опухолей достигал от 1008 до 1764 мм³, мышам-донорам умерщвляли, а опухоли асептически вырезали и препарировали. После удаления некротических участков опухоли разрезали на фрагменты размером примерно 20 мм³ и переносили в культуральную среду перед пересадкой SC самкам бестимусных мышам-реципиентов (экспериментальных). Опухоли измеряли (длина × ширина) два раза в неделю путем измерений с помощью двустороннего штангенциркуля с нониусом, и объем опухоли рассчитывали по формуле эллипса ($\pi/6 \times \text{ширина} \times \text{ширина} \times \text{длина}$). Массу тела животных и состояние опухоли отслеживали на всем протяжении исследования. Мышей рандомизировали в группы лечения, когда средний объем опухоли достигал примерно 110 мм³. Животные получали лечение, начиная со следующего дня после рандомизации. Контрольные животные получали лечение перорально (PO) один раз в день (QD) средой-носителем (деионизированная вода, подкисленная с помощью HCl до pH 3,5-4). AZD5305 вводили в дозе 1, 0,1 или 0,01 мг/кг PO QD. Карбоплатин вводили в дозе 50 мг/кг IP один раз в неделю (QW). В группе комбинированного лечения мышам вначале вводили дозу карбоплатина, а затем в течение 10 минут вводили AZD5305.

Ингибирование роста опухоли от начала лечения оценивали посредством сравнения среднего изменения объема опухоли в контрольных группах и группах лечения и представляли как процентное ингибирование роста (TGI, если TV \geq начальный TV) или регрессию опухоли (reg, если TV < начальный TV). Среднее процентное изменение массы тела от начала лечения также рассчитывали для всех групп. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего t-критерия. Статистическая значимость указана следующим образом: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Исследования переносимости с использованием AZD5305 в дозе 10 мг/кг PO QD в комбинации с карбоплатином в дозе 50 мг/кг IP QW проводились на самках мышам с SCID до начала исследования эффективности и не продемонстрировали нежелательных эффектов в отношении состояния животных или значительных изменений массы тела.

Образцы для РК плазмы крови получали путем сбора 400-600 мкл цельной крови посредством внутрисердечной пункции под ксилазин-кетаминевой анестезией. Кровь переносили в пробирки BD Microtainer Hep-Li с гелем-сепаратором и центрифугировали при 5000 об./мин в течение 5-10 минут при 4°C. Отделенную плазму крови собирали и хранили при -80°C. Для определения уровней соединений в образцах плазмы крови каждый

образец плазмы крови (25 мкл) получали с использованием соответствующего коэффициента разведения и сравнивали со стандартами на 11-точечной калибровочной кривой (1-10000 нМ), полученными в DMSO и внесенными в контрольную плазму крови. К ацетонитрилу (100 мкл) добавляли внутренний стандарт, после чего центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость (50 мкл) затем разбавляли в 300 мкл воды и анализировали с помощью UPLC-MS/MS.

Составление тестируемых материалов

AZD5305 составляли для перорального введения доз в среде-носителе, представляющей собой воду с HCl при pH 3,5-4, для введения в объеме дозы 0,1 мл/10 г. Твердое вещество разбавляли, добавляя соответствующий объем 1 н. HCl до молярного соотношения лекарственное средство/HCl, составляющего приблизительно 1:1,25, и 80% конечного объема стерильной деионизированной воды при перемешивании/вихревом перемешивании/обработке ультразвуком до получения раствора. Необходимый объем 1 н. HCl рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\text{объем добавленной 1 н. HCl (мл)} = 1,25 \times [\text{концентрация (мг/мл)} \div 406,48 \text{ (г/моль)} \div 1\text{M}] \times \text{конечный объем (мл)}$$

pH раствора доводили до 3,5-4 с помощью 1 н. HCl или 1 н. NaOH. Конечный объем составляли с использованием стерильной воды для инъекций или деионизированной воды, и конечный pH измеряли и записывали. Препараты для введения доз составляли один раз в неделю и защищали от света.

Карбоплатин (Sandoz) составляли свежим в каждый день введения доз путем разбавления исходного раствора в 0,9% NaCl до 5 мг/мл для дозы 50 мг/кг (объем дозы 0,1 мл/10 г).

РЕЗУЛЬТАТЫ

HBCx-9 представляет собой модель PDX TNBC, доступную от XenTech, Франция. О ней сообщалось как о модели BRCA1/2 wt с метилированием BRCA1, а также "признаками свойств по BRCA" [1]. Было также показано, что HBCx-9 обладает умеренной чувствительностью к монотерапии олапарибом [2].

AZD5305 в дозе 1, 0,1 и 0,01 мг/кг QD и карбоплатин в дозе 50 мг/кг QW тестировали в исследовании эффективности в качестве монотерапии и в комбинации. Все виды лечения хорошо переносились в течение всей продолжительности исследования (28 дней), и не наблюдалось значительной потери массы тела (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Монотерапия AZD5305 продемонстрировала дозозависимую противоопухолевую эффективность, обеспечивая 66%, 44% и 7% TGI в дозе 1, 0,1 и 0,01 мг/кг QD соответственно. Монотерапия карбоплатином приводила к 68% TGI. Лечение с помощью 1

мг/кг AZD5305 и карбоплатина продемонстрировало преимущество комбинации и обеспечивало 90% регрессию. Этот противоопухолевый эффект сохранялся даже при снижении уровня дозы AZD5305 в комбинации с карбоплатином до 0,1 мг/кг (86% регрессия). Эффект несколько снижался при использовании карбоплатина в комбинации с 0,01 мг/кг AZD5305 (49% TGI). Однако даже в этой группе обеспечивалось преимущество комбинации по сравнению с любой из групп монотерапии (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** и таблица).

В этом эксперименте лечение продолжалось в течение 28 дней, а затем продолжительность ответа отслеживалась без лечения. На графике в **Ошибка! Источник ссылки не найден.** изображено, что в группах с наибольшей эффективностью (карбоплатин в комбинации с AZD5305 в дозе 1 или 0,1 мг/кг) опухоли начинали повторно расти примерно в день 49 (через 3 недели после прекращения лечения), и скорость повторного роста была сходной между двумя группами. Кроме того, в группе карбоплатин + 0,01 мг/кг AZD5305 опухоли начинали повторно расти через приблизительно 2 недели после отмены лечения **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

В заключение, AZD5305 в комбинации с карбоплатином продемонстрировал улучшенный противоопухолевый эффект по сравнению с группами монотерапии в модели PDX HBCx-9 in vivo. Снижение уровня дозы AZD5305 в 10 раз (с 1 мг/кг до 0,1 мг/кг) в комбинации с карбоплатином не влияло на эффект регрессии опухоли.

Таблица 4. Сводная информация о противоопухолевых эффектах AZD5305, карбоплатина и комбинации обоих средств in vivo в модели HBCx-9

Модель опухоли	Лечение	Доза и схема	Продолжительность введения доз (дни)	Ингибирование роста/регрессия опухоли (конец лечения) (p-значение согласно t-критерию по сравнению с контролем в виде среды-носителя)
HBCx-9	Карбоплатин	50 мг/кг QW	28	68% TGI * ($p \leq 0,05$)
	AZD5305	1 мг/кг QD		66% TGI ** ($p \leq 0,01$)
	AZD5305	0,1 мг/кг QD		44% TGI ** ($p \leq 0,01$)
	AZD5305	0,01 мг/кг QD		7% TGI (незначимо)
	Карбоплатин + AZD5305	50 мг/кг QD + 1 мг/кг QD		90% регрессия *** ($p \leq 0,001$)

Таблица 4. Сводная информация о противоопухолевых эффектах AZD5305, карбоплатина и комбинации обоих средств in vivo в модели НВСх-9

Модель опухоли	Лечение	Доза и схема	Продолжительность введения доз (дни)	Ингибирование роста/регрессия опухоли (конец лечения) (p-значение согласно t-критерию по сравнению с контролем в виде среды-носителя)
	Карбоплатин + AZD5305	50 мг/кг QD + 0,1 мг/кг QD		86% регрессия *** ($p \leq 0,001$)
	Карбоплатин + AZD5305	50 мг/кг QD + 0,01 мг/кг QD		49% TGI ** ($p \leq 0,01$)

В данном письменном описании используются примеры для раскрытия настоящего изобретения и предоставления возможности любому специалисту в данной области техники реализовать настоящее изобретение на практике, включая получение и применение любых из раскрытых солей, веществ или композиций и выполнение любого из раскрытых способов или процессов. Патентоспособный объем настоящего изобретения определяется формулой изобретения и может включать другие примеры, которые приходят на ум специалистам в данной области техники. Предполагается, что такие другие примеры входят в объем формулы изобретения, если они содержат элементы, которые не отличаются от буквальных формулировок формулы изобретения, или если они включают эквивалентные элементы с несущественными отличиями от буквальных формулировок формулы изобретения. Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и описаны в данном описании, такие варианты осуществления представлены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо иным образом. Различные альтернативы описанным вариантам осуществления настоящего изобретения могут быть использованы при реализации настоящего изобретения на практике. Заголовки разделов, используемые в данном разделе и во всем настоящем раскрытии, не предназначены для ограничения.

Все приведенные выше литературные источники (патентные и непатентные) включены в данную патентную заявку посредством ссылки. Обсуждение данных литературных источников предназначено лишь для обобщения утверждений, сделанных их авторами. Не допускается, что какой-либо литературный источник (или часть какого-либо литературного

источника) относится к релевантному предшествующему уровню техники (или предшествующему уровню техники в целом). Заявители оставляют за собой право оспорить точность и актуальность цитируемых литературных источников.

Формула изобретения

1. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку первого количества AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли и второго количества химиотерапевтического средства на основе платины или его фармацевтически приемлемой соли; где первое количество и второе количество вместе составляют терапевтически эффективное количество.

2. Способ по п. 1, где рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где химиотерапевтическое средство на основе платины выбрано из любого из цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где рак представляет собой рак с дефектом гомологичной рекомбинации (HRD).

5. Способ по п. 4, где рак предусматривает одну или несколько клеток, имеющих мутацию в гене HRR, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*.

6. Способ по п. 5, где мутантный ген HRR выбран из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

7. Набор, содержащий:

первую фармацевтическую композицию, содержащую AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель; и

вторую фармацевтическую композицию, содержащую химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, и инструкции по применению.

8. AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака у субъекта, где указанное лечение включает раздельное, последовательное или одновременное введение i) указанного AZD5305 или его фармацевтически приемлемой соли и ii) химиотерапевтического средства на основе платины или его фармацевтически приемлемой соли указанному субъекту.

9. Соединение по п. 8, где рак выбран из рака яичника, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, гематологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, такого как рак желудка и колоректальный рак, и рака легкого.

10. Соединение по п. 8 или п. 9, где химиотерапевтическое средство на основе платины выбрано из любого из цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина.

11. Соединение по любому из пп. 8-10, где рак представляет собой рак с дефектом гомологичной рекомбинации (HRD).

12. Соединение по п. 11, где рак предусматривает клетки, имеющие мутацию в гене HRR, выбранном из *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *CDK12*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* и *RAD54L*.

13. Соединение по п. 12, где мутантный ген HRR выбран из *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM*.

14. Фармацевтический продукт, содержащий i) AZD5305 или его фармацевтически приемлемую соль и ii) химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемую соль.

15. Фармацевтический продукт по п. 14, где AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль и химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемая соль присутствуют в одной лекарственной форме.

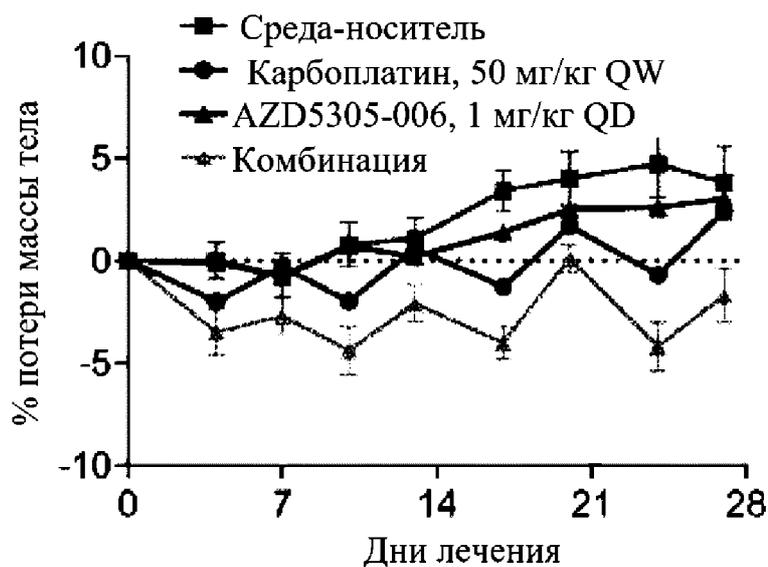
16. Фармацевтический продукт по п. 14, где AZD5305 или его фармацевтически приемлемая соль и химиотерапевтическое средство на основе платины или его фармацевтически приемлемая соль присутствуют в отдельных лекарственных формах.

17. Способ, соединение или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где химиотерапевтическое средство на основе платины включает в себя карбоплатин.

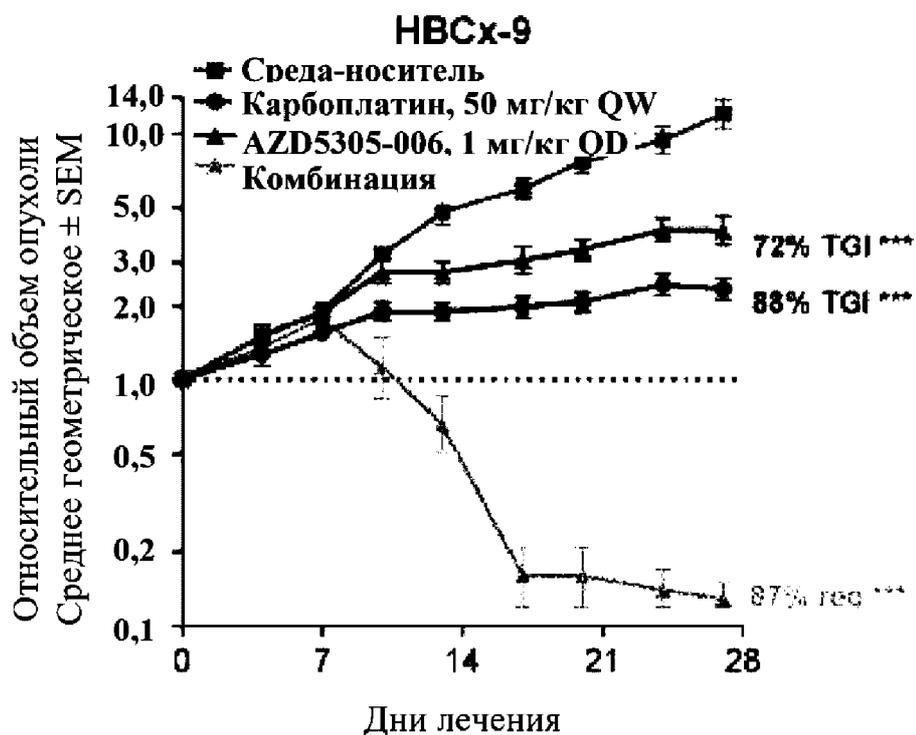
18. Способ, соединение или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где химиотерапевтическое средство на основе платины представляет собой карбоплатин.

19. Способ, соединение или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов, где AZD5305 представляет собой свободное основание.

ФИГ. 1. Процентное изменение массы тела в модели PDX НВСх-9

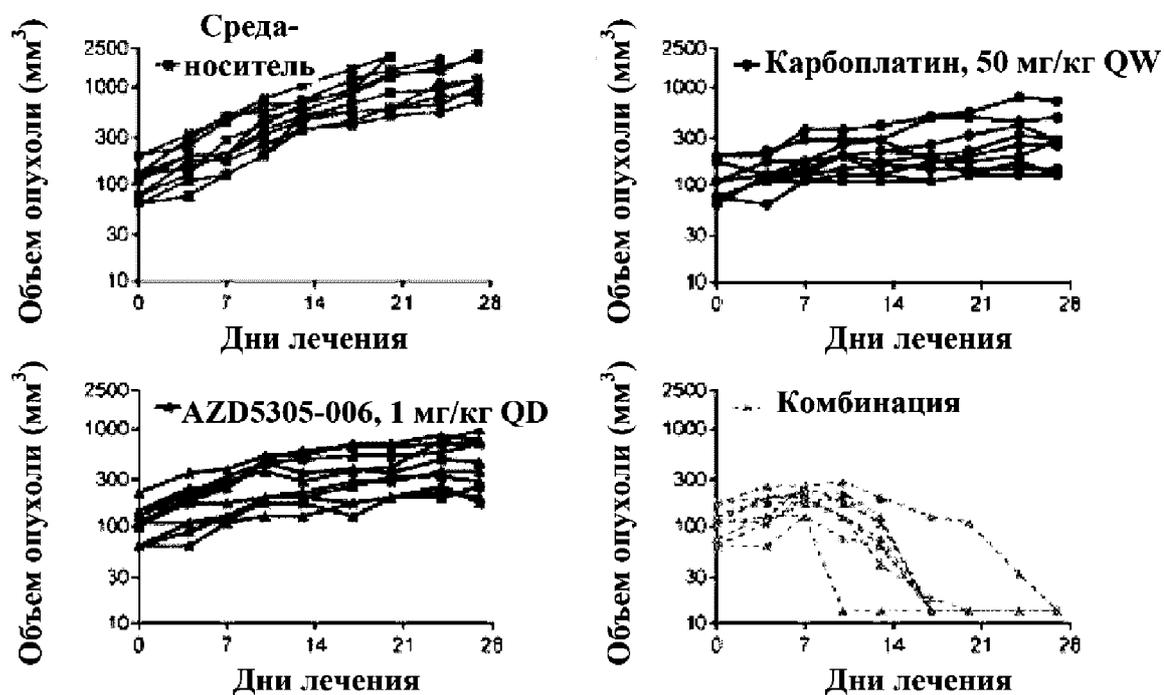


ФИГ. 2. Противоопухолевая активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели PDX НВСх-9

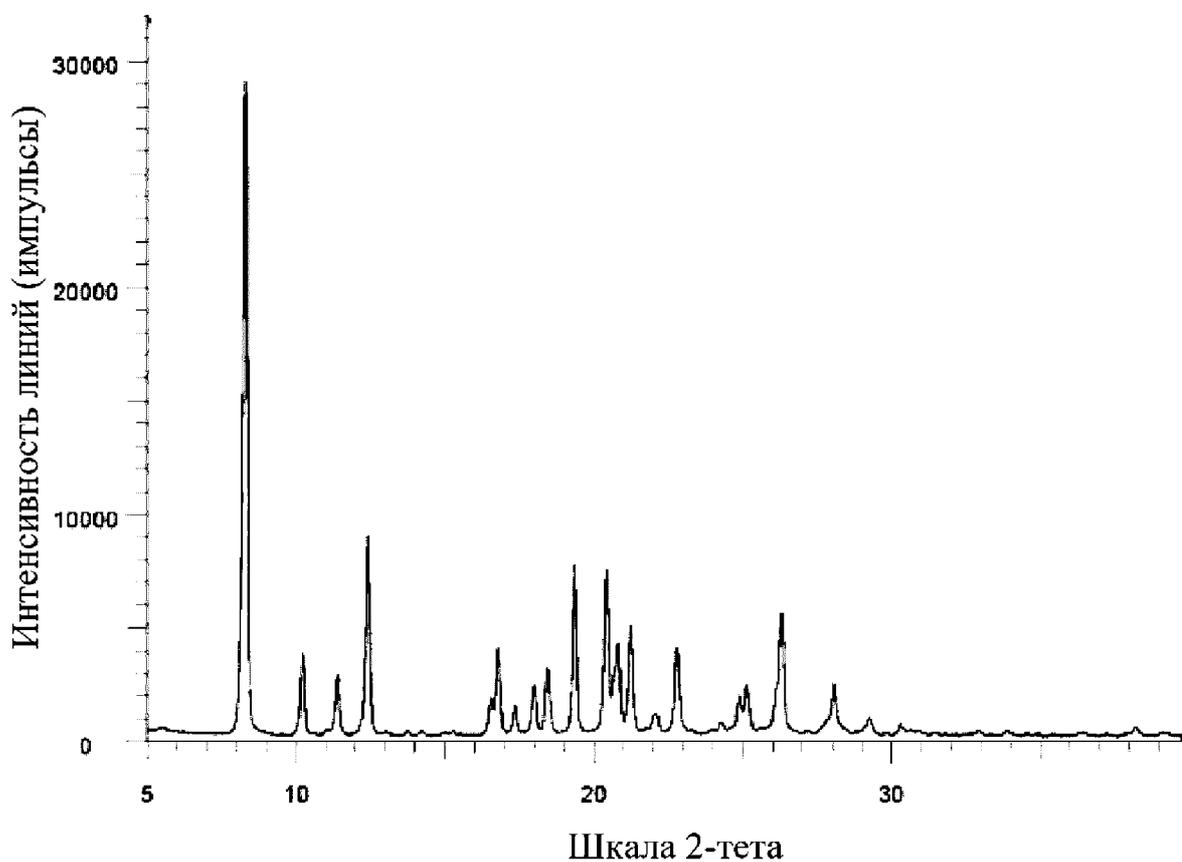


Начальный средний объем опухоли: $111 \pm 7 \text{ мм}^3$
 N = 7-10/группа

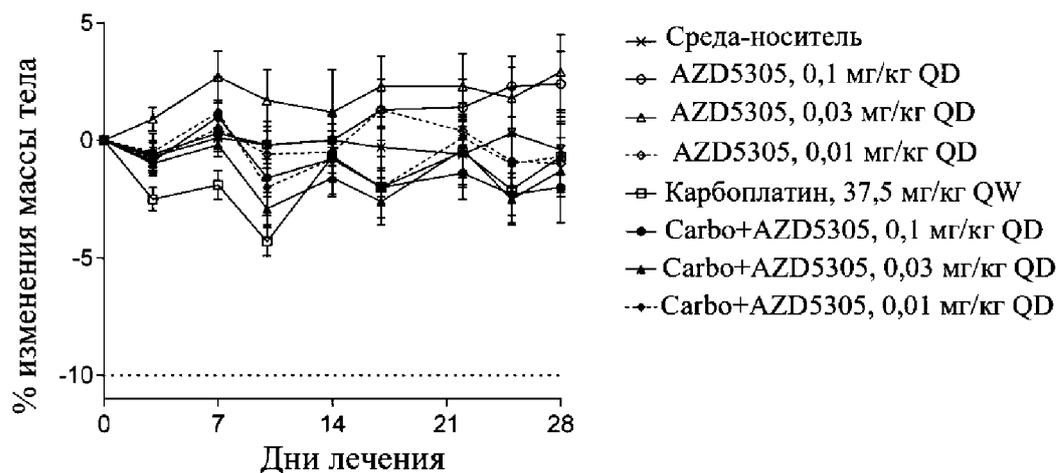
ФИГ. 3. Противоопухолевая активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели PDX НВСх-9 (отдельные животные)



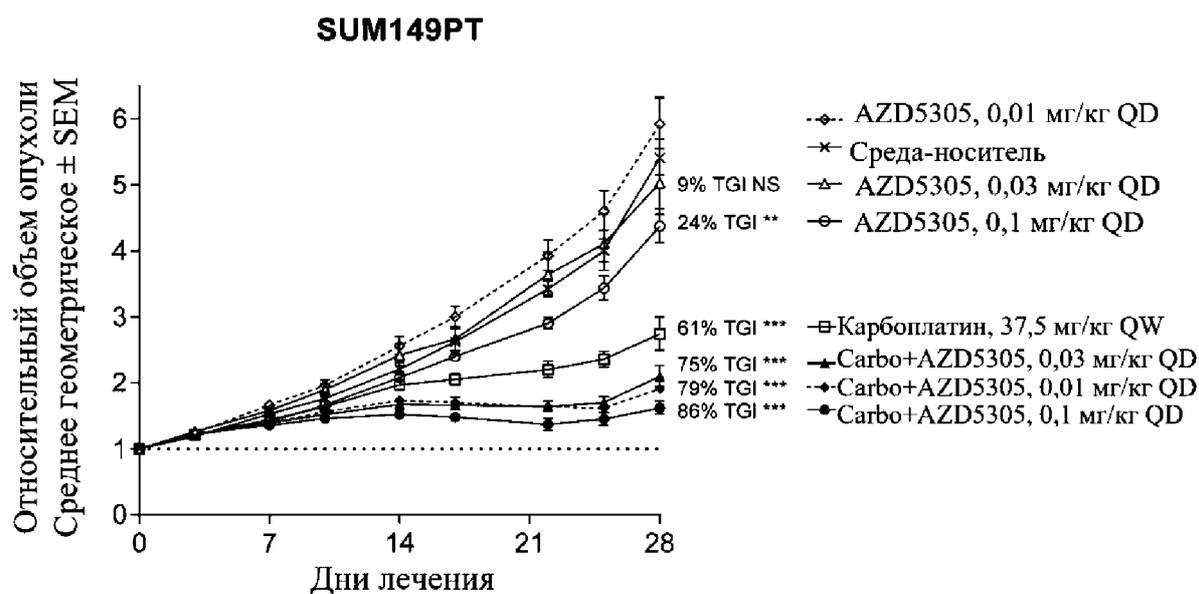
ФИГ. 4. XRPD-дифрактограмма формы А AZD5305



ФИГ. 5. Процентное изменение массы тела в ксенотрансплантатной модели SUM149PT



ФИГ. 6. Противоопухолевая активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в ксенотрансплантатной модели SUM149PT

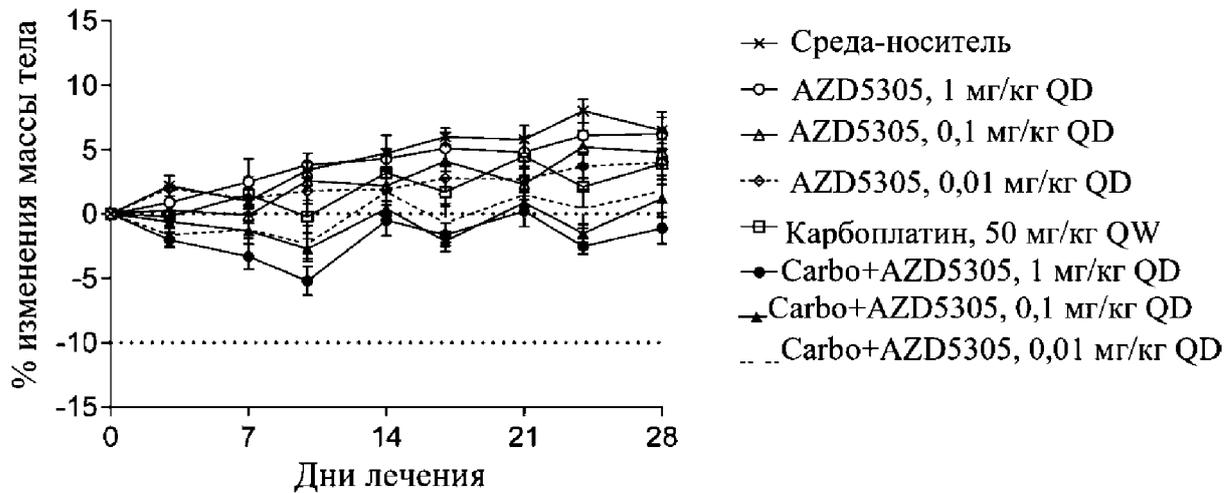


Введение доз РО

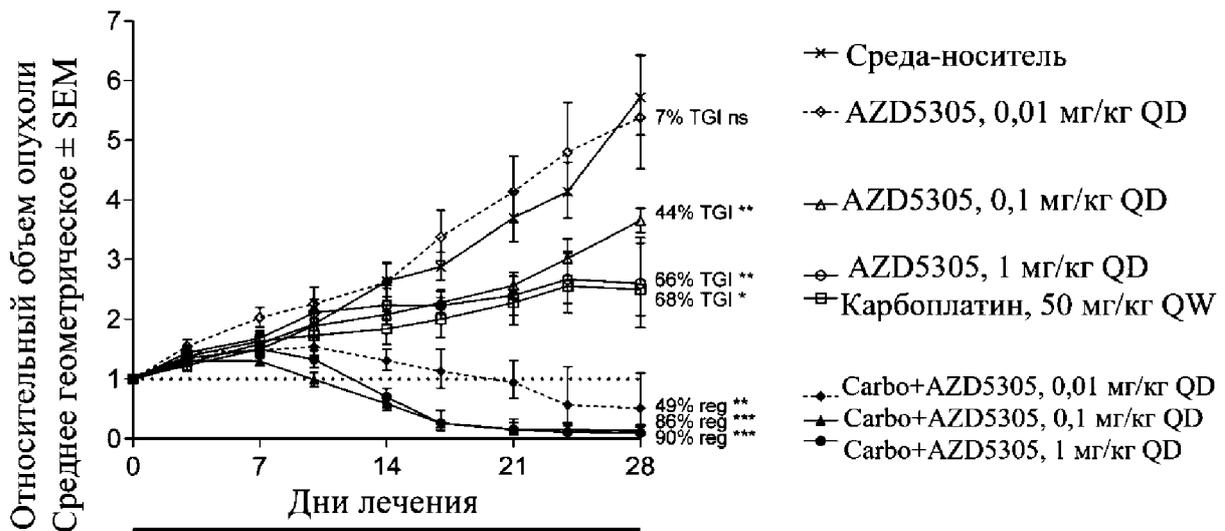
Начальный средний объем опухоли: $0,3 \pm 0,01 \text{ см}^3$

N = 5-9/группа

ФИГ. 7. Процентное изменение массы тела в модели PDX НВСх-9



ФИГ. 8. Противоопухолевая активность AZD5305 в комбинации с карбоплатином в модели НВСх-9



Введение доз РО

Начальный средний объем опухоли \pm SEM: $110 \pm 5 \text{ мм}^3$

N = 8/группа

ФИГ. 9. Продолжительность противоопухолевой активности AZD5305 в комбинации с карбоплатином после прекращения лечения в модели НВСх-9

