

**Пример письменной работы при сдаче экзамена научных работников российской научной или образовательной организации в целях аккредитации российской научной или образовательной организации в качестве организации, которая может проводить предварительный информационный поиск в отношении заявленных изобретений или полезных моделей и предварительную оценку их патентоспособности**

- 1) Провести предварительную оценку соответствия предлагаемого решения условиям патентоспособности;
- 2) Заполнить заключение о результатах предварительной оценки патентоспособности в отношении заявленного изобретения;
- 3) Заполнить отчёт о предварительном информационном поиске в отношении заявленного изобретения.

<b>ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ</b> оригиналов документов заявки <b>02.03.2017</b>	<b>(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №</b>	<b>ВХОДЯЩИЙ №</b>
<b>(85) ДАТА ПЕРЕВОДА</b> международной заявки на национальную фазу		
<input checked="" type="checkbox"/> (86) (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством)	<b>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ</b> (полный почтовый адрес, имя или наименование адресата)	
<input checked="" type="checkbox"/> (87) (номер и дата международной публикации международной заявки)	Телефон: mail:	
<b>ЗАЯВЛЕНИЕ</b> о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	<b>В Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам</b> Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
<b>(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ</b> Будет сообщено дополнительно		
<b>(71) ЗАЯВИТЕЛЬ</b> (Указывается полное имя или наименование (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, включая название страны и полный почтовый адрес)		
Указанное лицо является <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком, исполнитель работ  <input type="checkbox"/> исполнителем работ по <input type="checkbox"/> государственному <input type="checkbox"/> муниципальному контракту, заказчик работ  Контракт от №		<b>КОД страны по стандарту ВОИС ST.3</b> (если он установлен) JP
<b>(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ</b> Указанное(ые) ниже лицо(а) назначено (назначены) заявителем (заявителями) для ведения дел по получению патента от его (их) имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам		
Фамилия, имя, отчество (если оно имеется)		Является <input checked="" type="checkbox"/> Патентным(и) поверенным(и) <input type="checkbox"/> Иным представителем
Адрес:		Телефон:
		Факс:
		E-mail:
Срок представительства (заполняется в случае назначения иного представителя без представления доверенности)		Регистрационный(е) номер(а) патентного(ых) поверенного(ых)

(72) Автор (указывается полное имя)	Полный почтовый адрес места жительства, включающий официальное наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST.3	
Я прошу не упоминать меня как автора при публикации сведений <input type="checkbox"/> о заявке <input type="checkbox"/> о выдаче патента. Подпись автора		
<b>ПЕРЕЧЕНЬ ПРИЛАГАЕМЫХ ДОКУМЕНТОВ:</b>	Кол-во л. в 1 экз	Кол-во экз.
<input type="checkbox"/> Описание изобретения		
<input type="checkbox"/> Перечень последовательностей		
<input type="checkbox"/> Формула изобретения		
<input type="checkbox"/> Чертеж(и) и другие материалы		
<input type="checkbox"/> Реферат		
<input checked="" type="checkbox"/> Документ об уплате патентной пошлины: Регистрация заявки и принятие решения по результатам формальной экспертизы	1	
<input type="checkbox"/> Документ, подтверждающий наличие оснований для освобождения от уплаты патентной пошлины		
<input type="checkbox"/> Документ, подтверждающий наличие оснований для уменьшения размера патентной пошлины		
<input type="checkbox"/> Документ, подтверждающий наличие оснований для отсрочки уплаты патентной пошлины		
<input type="checkbox"/> Копия первой заявки		
<input type="checkbox"/> Перевод заявки на русский язык		
<input type="checkbox"/> Доверенность		
<input checked="" type="checkbox"/> ходатайство о личном кабинете	5	
<input checked="" type="checkbox"/> список поверенных	2	
<input checked="" type="checkbox"/> пояснения по адресам авторов для межд заявки	1	
Фигуры чертежей, предлагаемые для публикации с рефератом		

**ЗАЯВЛЕНИЕ НА ПРИОРИТЕТ** (Заполняется только при испрашивании приоритета более раннего, чем дата подачи заявки)

Прошу установить приоритет изобретения по дате

- 1  подачи первой заявки в государстве - участнике Парижской конвенции по охране промышленной собственности (п. 1 ст. 1382 Гражданского кодекса Российской Федерации) (далее - Кодекс)  
2  поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (п. 2 ст. 1381 Кодекса)  
3  подачи более ранней заявки (п. 3 ст. 1381 Кодекса) (более ранняя заявка считается отозванной на дату подачи настоящей заявки)  
4  подачи/приоритета первоначальной заявки (п. 4 ст. 1381 Кодекса), из которой выделена настоящая заявка

<input checked="" type="checkbox"/> N первой (более ранней, первоначальной) заявки	<input checked="" type="checkbox"/> Дата испрашиваемого приоритета	(33) Код страны подачи по стандарту <b>ВОИС ST.3</b> (при испрашивании конвенционного приоритета)
61/947,398	03.03.2014	US

**ХОДАТАЙСТВО ЗАЯВИТЕЛЯ:**

- осуществить публикацию сведений о заявке ранее установленного срока (п. 1 ст. 1385 Кодекса)  
 начать рассмотрение международной заявки ранее установленного срока (п. 1 ст. 1396 Кодекса)  
 провести экспертизу заявки на изобретение по существу (п. 1 ст. 1386 Кодекса)

Подпись

*Подпись заявителя или патентного поверенного, или иного представителя заявителя, дата подписи (при подписании от имени юридического лица подпись руководителя или иного уполномоченного на это лица удостоверяется печатью)*

## ПРИМЕНЕНИЕ ЭРИБУЛИНА И ИНГИБИТОРОВ mTOR В КАЧЕСТВЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ

### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

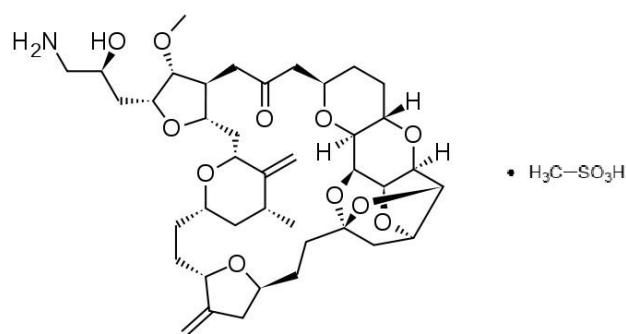
Злокачественное новообразование охватывает широкий спектр заболеваний, каждое из которых характеризуется неконтролируемым ростом клеток определенного типа. Оно начинается в ткани, содержащей такую клетку, и в случае, если злокачественное новообразование не распространилось на какие-либо дополнительные ткани в момент постановки диагноза, его можно лечить с помощью, например, хирургического вмешательства, облучения или другого типа локализованной терапии. Однако в случае, если есть свидетельства того, что злокачественное новообразование метастазировало из своей исходной ткани, то для лечения, как правило, применяют отличные подходы. В самом деле, поскольку не представляется возможным точно определить степень метастазирования, системные подходы к терапии предпринимаются, как правило, тогда, когда обнаружены какие-либо признаки распространения. Эти подходы могут включать в себя введение химиотерапевтических препаратов, которые мешают росту быстро делящихся клеток, таких как злокачественные клетки. Другие подходы предусматривают использование иммунотерапии, при которой у индивидуума вызывается или усиливается иммунный ответ против злокачественных клеток.

Галихондрин В представляет собой структурно сложное, макроциклическое соединение, которое первоначально было выделено из морской губки *Halichondria okadai*, а затем был обнаружено у *Axinella sp.*, *Phakellia carteri* и *Lissodendoryx sp.* Полный синтез галихондрина В был опубликован в 1992 году (Aicher et al., J. Am. Chem. Soc. 114:3162-3164, 1992). Было показано, что галихондрин ингибирует полимеризацию тубулина, сборку микротрубочек, сшивание бета<sup>S</sup> тубулина, связывание ГТФ и винбластина с

тубулином и тубулин-зависимый гидролиз ГТФ *in vitro*. Также было показано, что эта молекула обладает противораковыми свойствами *in vitro* и *in vivo*. Аналоги галихондрина В, обладающие противораковой активностью, описаны в патенте США N 6,214,865 В1.

Эрибулин представляет собой синтетический аналог галихондрина В. Эрибулин также известен как ER-086526, и ему был присвоен номер CAS 253128-41-5 и US NCI номер обозначения NSC-707389. Мезилатная соль эрибулина (эбулинмезилат, который продается под торговым названием HALAVEN<sup>®</sup> и также известен как E7389) одобрен для лечения пациентов с раком молочной железы, которые ранее получали, по меньшей мере, два химиотерапевтических режима для лечения метастатического заболевания, которые должны были включать антрациклин и таксан либо в адъювантном, либо в метастатическом назначении.

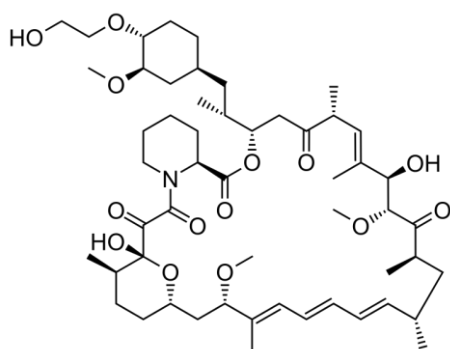
Химическое название для эрибулинмезилата представляет собой II,15:18,21:24,28-триэпоксид-7,9-этанон-12,15-метано-9H,15H-фурано[3,2-*i*]фурано[2',3':5,6]пирано-[4,3-*b*][1,4]диоксациклопентакозин-5(4H)-он,2-[(2S)-3-амино-2-гидроксипропил]гексакозагидро-3-метокси-26-метил-20,27-бис(метилен)-, (2R,3R,3aS,7R,8aS,9S,10aR,11S,12R,13aR,13bS,15S,18S,21S,24S,26R,28R,29aS)-метансульфонат (соль), и он может быть изображен следующим образом:



mTOR (также известный как мишень рапамицина у млекопитающих, механистическая мишень рапамицина и FK506-связывающий белок 12-рапамицин-ассоциированный белок 1 (FRAP1)) представляет собой серин/треониновую киназу, которая регулирует рост клеток, пролиферацию

клеток, подвижность клеток, выживаемость клеток, синтез белка и транскрипцию. mTOR принадлежит к белковому семейству киназ, родственных фосфатидилинозитол 3-киназам. mTOR комплекс 1 (mTORC1) состоит из mTOR, регуляторно-ассоциированного белка mTOR (Raptor), летальный у млекопитающих с SEC13 белком 8 (MLST8) и неосновных компонентов PRAS40 и Deptor. Этот комплекс функционирует как сенсор нутриент/энергии/окисления-восстановления, а также играет роль в регулировании синтеза белка.

Эверолимус (RAD-001) является ингибитором mTOR, и он оказывает свое действие на комплекс mTORC1. Эверолимус продается компанией Novartis под торговым наименованием Afinitor в онкологии. Химическим названием эверолимуса является дигидрокси-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-гидроксиэтокси)-3-метоксициклогексил]пропан-2-ил]-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0 гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-2,3,10,14,20-пентон, и он может быть изображен следующим образом:



### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение основывается на наблюдении, что комбинация эрибулинмесилата и ингибитора mTOR, эверолимуса демонстрирует улучшенные (например, синергетические) противоопухолевые эффекты. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам профилактики и лечения злокачественного новообразования путем применения комбинации эрибулина (например, эрибулинмесилата) и одного или более ингибиторов mTOR (например, эверолимуса).

При использовании термина "эрибулин" в данном описании, его следует рассматривать как указание на эрибулин или его фармацевтически приемлемую соль (например, эрибулинмезилат), если из контекста не следует иное. Аналогично, при использовании термина "ингибитор mTOR" (или название специфического ингибитора mTOR, такого как эверолимус) в данном описании, его следует рассматривать как указание на ингибитор mTOR или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого, когда это применимо, если контекст не указывает на иное.

Изобретение предоставляет способы лечения индивидуума (например, пациента-человека), имеющего злокачественное новообразование или подверженного риску его развития. Эти способы включают введение индивидууму (I) эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли (например, эрибулинмезилат), и (II) ингибитора мишени рапамицина млекопитающего (mTOR) (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус) или фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата или аморфного твердого вещества этого. Индивидууму может быть поставлен диагноз злокачественного новообразования, он может проходить лечение от злокачественного новообразования или восстанавливаться после лечения от злокачественного новообразования. В различных вариантах осуществления злокачественное новообразование может представлять собой первичную опухоль или метастаз, и необязательно может представлять собой твердую опухоль. В других вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака легкого, рака яичников, рака эндометрия, рака глотки, рака пищевода и саркомы.

Эрибулин или его фармацевтически приемлемую соль (например, Эрибулинмезилат) можно вводить путем внутривенной инфузии в течение, например, от 1 до примерно 20 минут, например, в течение примерно от 2 до примерно 5 минут. Количество эрибулина или его фармацевтически приемлемой



соли (например, Эрибулинмезилата) может находиться в пределах от примерно 0,1 мг/м<sup>2</sup> до примерно 20 мг/м<sup>2</sup> (например, 1,4 мг/м<sup>2</sup> или 1,1 мг/м<sup>2</sup>), необязательно вводимого один раз в день в каждый из дней 1 и 8 из 21-дневного цикла, или один раз в день в каждый из дней 1 и 15 из 28-дневного цикла.

Ингибитор mTOR (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус) можно вводить перорально в количестве, например, в пределах диапазона от примерно 0,1 мг до примерно 30 мг (например, 10 мг), а при желании можно вводить один раз в день во время 21-дневного цикла или 28-дневного цикла.

Эрибулин или его фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор mTOR (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус) или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого можно вводить, по существу, одновременно или последовательно. Например, эрибулин или его фармацевтически приемлемая соль могут быть введены до ингибитора mTOR (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус) или фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата или аморфного твердого вещества этого.

Кроме того, эрибулин или его фармацевтически приемлемая соль (например, Эрибулинмезилат), и ингибитор mTOR (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус), или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого можно дополнительно вводить в качестве индивидуальных противораковых средств.

Лечение в соответствии со способами по настоящему изобретению: (I) уменьшает число злокачественных клеток; (II) уменьшает объем опухоли; (III) увеличивает скорость регрессии опухоли; (IV) снижает или замедляет инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; (V) уменьшает или замедляет метастазирование опухоли; (VI) снижает или ингибирует рост опухоли; (VII) предотвращает или задерживает возникновение и/или рецидив злокачественного новообразования и/или удлиняет время

выживания без признаков заболевания и опухоли; (VIII), увеличивает общее время выживания; (IX) снижает частоту лечения; и/или (X) снимает один или более симптомов, связанных со злокачественным новообразованием.

Изобретение также относится к способам уменьшения размера опухоли у индивидуума (например, у пациента-человека). Эти способы включают введение индивидууму (I) эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли (например, эрибулинмезилата), и (II) ингибитора mTOR (например, эверолимуса, ридафоролимуса или темсиролимуса) или фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата или аморфного вещества этого. Эти способы могут включать режимы введения и злокачественные новообразования, описанные выше, и в других местах в настоящем документе.

Также в изобретение включены наборы для применения для предупреждения или лечения злокачественного новообразования или уменьшения размера опухоли (также смотри, например, эффекты, перечисленные выше). Наборы могут включать в себя (I) эрибулин или его фармацевтически приемлемую соль, и (II) ингибитор mTOR (например, эверолимус, ридафоролимус или темсиролимус) или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого, необязательно в лекарственной форме.

Кроме того, изобретение включает фармацевтические композиции, включающие средства, отмеченные в настоящем изобретении, для применения при профилактике и лечении заболеваний и состояний, отмеченных в настоящем документе. Кроме того, изобретение включает в себя применение средств, отмеченных в настоящем документе для получения лекарственных средств и/или для профилактики или лечения этих заболеваний и состояний.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают более высокую эффективность против злокачественного новообразования. Например, способы комбинированного лечения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения синергических эффектов, при которых, например,

эффекты являются большими, чем сумма эффектов этих лекарственных препаратов, вводимых по отдельности, что может быть определено специалистами в данной области техники. Аддитивные эффекты также являются полезными.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из приведенного ниже подробного описания, чертежей и формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 представлен график, показывающий эффект лечения E7389 на среднюю массу тела самок бестимусных голых мышей с подкожно имплантированными ксенотрансплантатами опухоли молочной железы MX-1.

На фигуре 2 представлен график, показывающий ответ SC имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1 на лечение E7389.

На фиг. 3 представлен график, показывающий эффект лечения эверолимусом на среднюю массу тела самок бестимусных голых мышей с подкожно имплантированными ксенотрансплантатами опухоли молочной железы MX-1.

Фиг.4 представляет собой график, показывающий ответ SC имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1 на лечение эверолимусом.

Фиг.5 представляет собой график, показывающий эффект лечения E7389 в комбинации с эверолимусом (40 мг/кг/доза) на среднюю массу тела самок бестимусных голых мышей с подкожно имплантированными ксенотрансплантатами опухоли молочной железы MX-1.

Фиг.6 представляет собой график, показывающий эффект лечения E7389 в комбинации с эверолимусом (20 мг/кг/доза) на среднюю массу тела самок бестимусных голых мышей с подкожно имплантированными ксенотрансплантатами опухоли молочной железы MX-1.

На фигуре 7 приведен график, показывающий ответ SC имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1 на лечение E7389 (0,6 мг/кг/инъек) в комбинации с эверолимусом.

Фиг.8 представляет собой график, показывающий ответ SC имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1 на лечение E7389 (0,4 мг/кг/инъек) в комбинации с эверолимусом.

На фиг.9 представлен график, показывающий ответ SC имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1 на лечение E7389 (0,2 мг/кг/инъек) в комбинации с эверолимусом.

Фигура 10 иллюстрирует количественное определение Объема Лече с использованием Аддитивности Лече. Синергию можно определить количественно по отношению к модели формирования Аддитивности Лече, которая построена из дозовых ответов на отдельные средства. Модель аддитивности служит в качестве "нулевой гипотезы" и не принимает на себя синергическое взаимодействие между химическими препаратами А и В. Как было отмечено на фигуре, самый высокий уровень эффекта при любой концентрации диктует форму модели. Для количественной оценки Объема Лече эмпирическая поверхность данных вычитается из модели формирования аддитивности. Объем Лече представляет собой суммирование любой остаточной избыточной активности по всей матрице комбинации доз.

На фигуре 11 показывает  $GI_{50}$  эрибулина по всей панели из двадцати пяти линий клеток. Среднее значение  $GI_{50}$  по всей панели клеточных линий составляет 0,51 нм. Анализ доз отдельных средств проводили в форматах 1536-луночных и 384-луночных планшетов с использованием трехкратного, десятикратного титрования дозы. Верхняя гистограмма отображает данные клеточной линии за счет увеличения чувствительности к эрибулину. Нижняя гистограмма отображает активность отдельного средства эрибулина в различных типах опухолей.

На фигуре 12 показана матрица доз форматом  $6 \times 6$ . Энхансерная дозовая

кривая отдельного средства показана по вертикальной оси. Дозовая кривая энхансии отдельного средства показана по горизонтальной оси. Каждый из энхансии и энхансера собирают в виде серий доз отдельного средства из пяти точек, в то время как в общей сложности двадцать пять точек соотношения комбинированных доз собирают в матрице доз 6×6.

На фигуре 13 показана синергия оценка значения Теплокарта для эверолимусом. Анализ проводился с использованием шести типов опухоли молочной железы (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, SK-BR-3 и T47D), шести типов опухоли легкого (A549, NCI-H1650, NCI-H460, NCI-H522, NCI-H526 и NCI-H69), два типов опухоли яичника (A2780 и SK-OV-3) и выборки по одному представителю клеточных линий других типов опухолей. Двадцать пять клеточных линий изображены по горизонтальной оси. Для этого анализа была определена отсечка Балльной оценки Синергии 4,42. Показаны комбинированные активности (данные ингибирования роста) для комбинации эверолимуса и эрибулина в клетках MDA-MB-468, T47D, NCI-H69, A2780, FaDu и HT-1080.

На фигуре 14 показаны значения балльных оценок синергии и балльных оценок Объема Лева для эверолимуса в указанных типах клеток.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам профилактики и лечения злокачественного новообразования, включающим введение эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли (например, эрибулинмезилата) и одного или несколько ингибиторов mTOR (например, эверолимуса). Лечение злокачественного новообразования путем введения эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли (например, эрибулинмезилата) и эверолимуса, в соответствии со способами по настоящему изобретению, может (I) уменьшать число злокачественных клеток; (II) уменьшать объем опухоли; (III) увеличивать скорость регрессии опухоли; (IV) уменьшать или замедлять проникновение злокачественных клеток в периферические органы; (V)

уменьшать или замедлять метастазирование опухоли; (VI) снижать или ингибировать рост опухоли; (VII) предотвращает или задерживает возникновение и/или рецидив злокачественного новообразования и/или удлиняет время выживания без признаков заболевания и опухоли; (VIII), увеличивает общее время выживания; (IX) снижает частоту лечения; и/или (X) снимает один или более симптомов, связанных со злокачественным новообразованием.

### **Фармацевтические композиции, дозировки и способы**

Способы синтеза эрибулина описаны, например, в патенте США № 6214865; патенте США № 7982060; патенте США № 8350067; и в патенте США № 8093410, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Как было отмечено выше, эрибулинмезилат коммерчески доступен и продается как HALAVEN<sup>®</sup>. Способы, относящиеся к эверолимусу и его синтезу, описаны, например, в патентах США №№ 5665772, 6004973, 7297703, 8410131, 8436010, которые включены в данное описание в качестве ссылки. Кроме того, как было отмечено выше, эверолимус продается как AFINITOR<sup>®</sup>. Как будет обсуждаться далее, ингибиторы mTOR в дополнение к эверолимусу также могут быть использованы в настоящем изобретении, и коммерчески доступны или могут быть синтезированы с использованием способов, известных в данной области техники.

Как было отмечено выше, эрибулин и/или ингибитор mTOR (например, эверолимус) необязательно может быть использован в настоящем изобретении в солевых формах. В отношении того, является ли используемая соль солью неорганической кислоты или солью органической кислоты, особых ограничений не существует. Например, соль может быть выбрана из соли мезиловой кислоты (например, эрибулинмезилата), соли соляной кислоты, соли серной кислоты, соли лимонной кислоты, соли бромистоводородной кислоты, соли йодистоводородной кислоты, соли азотной кислоты, бисульфата, соли фосфорной кислоты, соли суперфосфорной кислоты, соли изоникотиновой

кислоты, соли уксусной кислоты, соли молочной кислоты, соли салициловой кислоты, соли винной кислоты, соли пантотеновой кислоты, соли аскорбиновой кислоты, соли янтарной кислоты, соли малеиновой кислоты, соли фумаровой кислоты, соли глюконовой кислоты, соли сахариновой кислоты, соли муравьиной кислоты, соли бензойной кислоты, соли глутаминовой кислоты, соли метансульфоновой кислоты, соли этансульфоновой кислоты, соли бензолсульфоновой кислоты, соли р-толуолсульфоновой кислоты, соли памоиновой кислоты (памоат) и так далее. Кроме того, допустимо использовать соль алюминия, кальция, лития, магния, натрия, цинка и диэтанолamina.

Фармацевтические композиции, в том числе эрибулина и/или ингибитора mTOR (например, эверолимус) могут быть получены с использованием стандартных способов, известных в данной области (смотри, например, патентные документы, указанные выше). Как правило, эрибулин и ингибитор mTOR (например, эверолимус), используемые в настоящем изобретении, включены в отдельные фармацевтические композиции, но они могут, по желанию, быть включены в единую композицию. Эрибулин обычно предоставляется в жидкой форме для внутривенного введения, в то время как ингибитор mTOR (например, эверолимус), как правило, предоставляется в форме таблеток для перорального применения.

Фармацевтические композиции, используемые в изобретении, могут быть получены, например, смешиванием или растворением активного ингредиента (ов), имеющего требуемую степень чистоты, в физиологически приемлемом разбавителе, носителе, наполнителе или стабилизаторе (смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences (20<sup>th</sup> edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Приемлемые разбавители включают воду и физиологический раствор, необязательно включающий буферы, такие как фосфорную, лимонную или другие органические кислоты; антиоксиданты, включая бутилгидрокситолуол (БНТ), бутилгидроксианизол (БНА), аскорбиновую кислоту; полипептиды с низкой молекулярной массой

(приблизительно менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN<sup>®</sup>, PLURONICS<sup>®</sup> или ПЭГ.

При приготовлении композиций для пероральной лекарственной формы (например, композиции, включающие ингибитор mTOR, такой как эверолимус), любая из обычных фармацевтических сред может быть использована, например, вода, гликоли, масла, спирты, корригенты, консерванты, красители. Кроме того, носители, такие как крахмалы, сахара, микрокристаллическая целлюлоза, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и тому подобное могут быть использованы в случае пероральных твердых препаратов, таких как, например, порошки, капсулы и таблетки.

Необязательно, составы по изобретению содержат фармацевтически приемлемый консервант. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация консерванта находится в пределах диапазона от 0,1 до 2,0%, как правило, об/об. Подходящие консерванты включают такие, которые известны в фармацевтической области, такие как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, метилпарабен и пропилпарабен. Кроме того, составы с эрибулином и/или ингибитором mTOR (например, эверолимусом) могут необязательно включать фармацевтически приемлемую соль, такую как хлорид натрия, например, в физиологических концентрациях. Так, например, в одном примере эрибулин (например, эрибулинмезилата) формулируют в 0,9% растворе хлорида натрия для инъекций (USP).

Составы, отмеченные выше, (и другие) могут быть использованы для



парентерального введения лекарственных препаратов. Таким образом, препараты могут быть введены способами, включая внутривенный, внутритропухолевый, периопухоловый, внутриартериальный, интрадермальный, внутрипузырный, офтальмологический, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, легочный, подкожный и чрескожный способы. Другие способы также могут быть использованы, в том числе, например, через слизистую оболочку, трансдермальный, ингаляционный, интравагинальный, ректальный, а также способы перорального введения.

Дозировка вводимых композиций с эрибулином и/или ингибитором mTOR (например, эверолимусом) может значительно отличаться в зависимости от типа целевого заболевания, выбор способа доставки, а также возраста, пола и массы пациента, тяжести симптомов, наряду с другими факторами.

Суточная доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) может находиться в диапазоне, например, от 0,001 мг/м<sup>2</sup> до примерно 100 мг/м<sup>2</sup> (например, в диапазоне приблизительно от 0,1 мг/м<sup>2</sup> до примерно 50 мг/м<sup>2</sup> или в пределах от примерно 0,7 мг/м<sup>2</sup> до примерно 1,5 мг/м<sup>2</sup>, или в каком-либо одном количестве в этих пределах (например, 1,4 мг/м<sup>2</sup> или 1,1 мг/м<sup>2</sup>)). Эрибулин можно вводить в виде однократной дозы один раз в день, неделю, раз в две недели, месяц или год, или более чем одну дозу эрибулина можно вводить раз в день, неделю, раз в две недели, месяц или год. Введение может являться необязательно внутривенным, например, в течение приблизительно от 1 до 20 минут, или в течение приблизительно от 2 до приблизительно 5 минут. Например, в одном протоколе введения, эрибулин можно вводить один раз в дни 1 и 8 21-дневного цикла. Более конкретно, типичная доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) составляет 1,4 мг/м<sup>2</sup>, вводимая внутривенно в течение от 2-х до 5 минут в дни 1 и 8 21-дневного цикла. Кроме того, рекомендуемая доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) для пациентов со слабой печеночной недостаточностью (Child-Pugh A) составляет 1,1 мг/м<sup>2</sup>, вводимая внутривенно в течение от 2 до 5 минут в 1-й и 8 день 21-дневного цикла, в то время как

рекомендуемая доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) у пациентов с умеренной печеночной недостаточностью (Child-Pugh B) составляет  $0,7 \text{ мг/м}^2$ , вводимая внутривенно в течение от 2 до 5 минут в 1-й и 8 день 21-дневного цикла. Далее, рекомендуемая доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) у пациентов с умеренным нарушением функции почек (выведение креатинина 30-50 мл/ мин) составляет  $1,1 \text{ мг/м}^2$  вводят внутривенно в течение 2 до 5 минут на 1-й и 8 из 21-дневного цикла. В другом примере, эрибулин (например, эрибулинмезилат) можно вводить по схеме раз в две недели, например, один раз в каждый из дней 1 и 15 28-дневного цикла. Более конкретно, примерная доза эрибулина (например, эрибулинмезилата) составляет  $1,4 \text{ мг/м}^2$ , вводимая внутривенно в течение от 2-х до 5 минут в каждый из дней 1 и 15 28-дневного цикла. Отмеченные выше снижения дозировки,  $1,1 \text{ мг/м}^2$  в случае пациентов со слабыми печеночными нарушениями или умеренным нарушением функции почек, а также  $0,7 \text{ мг/м}^2$  в случае пациентов с умеренным нарушением функции печени, также могут применяться по схеме раз в две недели. Эти или другие более низкие дозы эрибулина (например, эрибулинмезилата) необязательно можно использовать в контексте пациентов, имеющих побочные реакции (например, гематологические или других побочных реакций) или в комбинированной терапии, в соответствии со способами по настоящему изобретению.

Ингибиторы mTOR можно вводить с помощью стандартных в данной области техники подходов и режимы дозирования. Эверолимус, например, можно вводить перорально в интервале от примерно 1 мг/ сутки до примерно 20 мг/ день (например, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 или 15 мг/ сут), в разовой или разделенных дозах. Эверолимус можно вводить в виде однократной дозы один раз в день, неделю, месяц или год, или более чем одной дозы эверолимуса можно вводить в день, неделю, месяц или год. Например, в одном протоколе введения, эверолимус можно вводить ежедневно в течение курса лечения эрибулином (смотри выше) и, при необходимости, введение эверолимуса может

продолжаться и после схемы лечения эрибулином. В других вариантах осуществления эверолимус можно вводить с уменьшением шаговой дозы, таким образом, что вторая и последующие вводимые дозы снижаются по отношению к первой, и предшествующей, дозе. В случае других примеров ингибиторов mTOR, ридафоролимус (Merck & Company и ARIAD Pharmaceuticals), например, можно вводить в дозе 40 мг QDx5/ неделю, в то время как темсиролимус (Pfizer Inc.) можно вводить в количестве 25 мг, с введением один раз в неделю в течение 30-60 минут. Эти количества и схемы лечения можно варьировать, что определяется соответствующими специалистами в данной области техники.

Композиции эрибулина и ингибитора mTOR (например, эверолимуса) можно вводить пациенту, по существу, одновременно или последовательно и в любом порядке (например, введение эрибулина перед ингибитором mTOR (например, эверолимусом), или наоборот). В одном примере, эрибулин вводят до (например, 1 -12 часов или 1 -3 дней до) начала введения ингибитора mTOR (например, эверолимуса). Многие схемы лечения, используемые для введения химиотерапевтических средств, включают, например, внутривенное введение лекарственного средства (или лекарственных средств), с последующим повторением этого лечения после периода (например, 1-4 недель), в течение которого пациент восстанавливается от каких-либо неблагоприятных побочных эффектов лечения. Может быть желательным использовать как эрибулин, так и ингибитор mTOR (например, эверолимус) при каждом введении или, альтернативно, иметь некоторые (или все) из способов лечения, включающих только эрибулин или только ингибитор mTOR (например, эверолимус).

В качестве конкретного неограничивающего примера схемы лечения, включенной в изобретение, эрибулин (например, 0,01 -5 мг/м<sup>2</sup>, например, 1,1 мг/м<sup>2</sup> или 1,4 мг/м<sup>2</sup>) вводят пациенту с помощью внутривенной инфузии в течение от 1 до 20 минут (например, в течение от 2-х до 5 минут) в дни 1 и 8 21-дневного цикла (или в дни 1 и 15 28-дневного цикла), в то время как ингибитор mTOR, такой как эверолимус, вводят ежедневно (например, 1-20 мг или 10 мг) в

течение этого цикла. Этот курс лечения можно повторять (например, 1-8, 2-6, или 4-5 раз), если специалистам в данной области техники определено, что он является переносимым и эффективным.

В дополнение к эрибулину и ингибитору mTOR (например, эверолимусу), способы по настоящему изобретению могут также включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. Среди этих средств, подходящими являются иммуномодулирующие средства (например, антитела или вакцины), химиотерапевтические /противоопухолевые средства, антибактериальные средства, противорвотные и противовоспалительные средства. В одном конкретном примере, эрибулин (например, эрибулинмезилат) и ингибитор mTOR (например, эверолимус) вводят в комбинации с ВКМ-120 (Vuparlisib), перорально биодоступный, специфический пероральный ингибитор семейства пан-класса I фосфатидилинозитол-3-киназ (PI3K) липидных киназ. В этом примере эрибулин и ингибитор mTOR можно необязательно вводить, как отмечено выше, в то время как ВКМ-120 можно вводить в диапазоне, например, от примерно 0,01 мг до примерно 200 мг, например, приблизительно от 50 мг до примерно 150 мг, или какое-либо определенное количество в пределах этого диапазона (например, 100 мг), в виде разовой дозы один раз в день, еженедельно или ежемесячно в течение курса, или за его пределами, лечения эрибулином и mTOR. В других случаях, эрибулин (например, эрибулинмезилат) и ингибитор mTOR (например, эверолимус) могут быть использованы в схеме лечения в качестве единственных терапевтических (например, единственных противораковых) средств. Таким образом, способы по изобретению могут состоять из введения (I) эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли (например, эрибулинмезилата), и (II) ингибитора mTOR (например, эверолимуса).

Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения (в том числе, например, замедления развития) или профилактики злокачественного новообразования у индивидуума (например, пациента-

человека), и/или для уменьшения размера опухоли. Индивидууму может быть поставлен диагноз злокачественного новообразования, он может находиться под риском развития злокачественного новообразования, проходить лечение от злокачественного новообразования или находиться в процессе восстановления после терапии от злокачественного новообразования. Кроме того, способы могут быть использованы для лечения или профилактики метастазов и/или рецидивов. Лечение может быть только химиотерапевтическим, хотя предусмотрено также лечение в сочетании с хирургической процедурой для удаления или уменьшения размера опухоли, лучевой терапией, иммунотерапией и/или абляционной терапией.

Типы злокачественных новообразований, которые можно лечить в соответствии с настоящими способами, включают, например, рак молочной железы (например, рецептор эстрогена положительный или отрицательный, рецептор прогестерона положительный или отрицательный, HER-2 положительный или отрицательный или тройной отрицательный рак молочной железы), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак яичника, фарингеальный рак, рак пищевода и саркому.

### **Наборы**

Изобретение также относится к наборам, которые включают емкость с эрибулином (например, эрибулинмезилатом) и/или емкость с ингибитором mTOR (например, эверолимусом). Эрибулин (например, эрибулинмезилат) и/или ингибитор mTOR (например, эверолимус) в таких наборах могут быть представлены в количествах, достаточных для лечения злокачественного новообразования у пациента, нуждающегося в этом (например, количества, достаточные для однократного введения или для многократного введения). При этом наборы могут включать несколько емкостей, каждая из которых включает эффективное количество разовой дозы фармацевтической композиции(й) эрибулина (например, эрибулинмезилата) и/или ингибитора mTOR (например, эверолимуса). По желанию, инструменты и/или устройства, необходимые для

введения фармацевтической композиции (й), могут быть также включены в наборы. Кроме того, наборы могут включать в себя дополнительные компоненты, такие как инструкции или схемы введения, для лечения пациента со злокачественным новообразованием эрибулином (например, эрибулинмезилатом) и/или ингибитором mTOR (например, эверолимусом).

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

### Экспериментальные примеры

#### Пример 1

#### Краткое изложение

Цель данного исследования состояла в том, чтобы определить влияние E7389 (эрибулинмезилата) при введении в комбинации с эверолимусом на рост подкожно имплантированных ксенотрансплантатов опухоли молочной железы человека MX-1 у самок бестимусных мышей NCr-nu/nu. В общей сложности 120 мышей с опухолью разделили на двенадцать групп по 10 мышей. Группа 1 получала лечение носителями E7389 и эверолимуса [2,5% ДМСО/ 97,5% физиологического раствора, внутривенно (IV), один раз в четыре дня в общей сложности четыре инъекции (Q4Dx4) и 0,5% метилцеллюлозы/ 0,2% полисорбата 80 в воде для инъекций, перорально через зонд (PO), один раз в день в течение 16 последовательных дней (Q1Dx16)], соответственно. Группы 2, 3 и 4 получали лечение E7389 в трех дозах (0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекцию), вводимых внутривенно по схеме Q4Dx4. Группы 5 и 6 получали лечение эверолимусом в двух дозах (40 и 20 мг/кг/доза), вводимых PO по схеме Q1Dx16. Группы 7, 8 и 9 получали лечение E7389 при дозах 0,6, 0,4, или 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 мг/кг/дозу. Группы 10, 11 и 12 получали лечение E7389 при дозах 0,6, 0,4, или 0,2 мг/кг/инъекцию в сочетании с эверолимусом в дозе 20 мг/кг/дозу. Эверолимус вводили через шесть часов после E7389. Все процедуры начинали через 10 дней после имплантации опухолевых ксенотрансплантатов.

Рост ксенотрансплантатов опухоли молочной железы человека МХ-1 был чувствительным к лечению E7389 при введении IV по графику Q4Dx4 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекцию, что приводит к статистически достоверному ингибированию роста опухоли во всех трех группах. Введение E7389 в дозе 0,6 мг/кг/инъекция привело к шести полным регрессиям опухолей и пяти выживших без опухолей. Введение эверолимуса PO в дозах 40 и 20 мг/кг/доза по схеме Q1Dx16 привело к минимальному, но статистически значимому ингибированию роста опухоли при обеих испытываемых дозах. Лечение E7389 при дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза переносилось и приводило к статистически значимому ингибированию роста ксенотрансплантатов опухоли молочной железы МХ-1.

Рост опухолей в двух комбинированных группах, в которых E7389 вводили в дозе 0,6 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза статистически не отличался от роста опухолей в группах, получавших только E7389, на основании времен достижения для отдельных животных четырех удвоений опухолевой массы и масс опухолей отдельных животных в день 62. В то время как рост опухолей в группах, в которых E7389 вводили в дозе 0,4 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении времен достижения для отдельных животных четырех удвоений опухолевой массы, различие не достигало того, чтобы быть значимым в случае, когда у отдельных животных сравнивали массы опухолей в день 52. Противоопухолевая активность обеих комбинированных терапий была больше, чем аддитивная, по сравнению с противоопухолевой активностью, полученной путем введения каждого соединения по отдельности, на основе сравнения средних задержек роста опухоли. Рост опухолей в двух группах, в которых E7389 вводили в дозе 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении времен достижения для отдельных животных

четырёх удвоений опухолевой массы и масс опухолей отдельных животных в день 41. Противоопухолевая активность обеих комбинированных терапий была аддитивной, по сравнению с противоопухолевой активностью при введении каждого соединения по отдельности, на основании сравнения средних значений задержки роста опухоли. Введение эверолимуса приводило к временной сухости кожи животных (такая сухость кожи не была отмечена в контрольной или получавшей E7389 группах). Степень сухости кожи во всех комбинационных группах оказалась меньше, чем наблюдалось в группах, получавших только эверолимус. В данном исследовании оценивали противоопухолевую эффективность соединения E7389 при введении в комбинации с ингибитором mTOR (мишень для рапамицина у млекопитающих), эверолимусом самкам бестимусных мышей NCr-nu/nu с имплантированными подкожно (SC) ксенотрансплантатами опухоли молочной железы человека MX-1.

#### Материалы и методы

##### Содержание животных

Шестинедельные самки бестимусных мышей NCr-nu/nu были приобретены у Charles River Laboratories (Уилмингтон, штат Массачусетс) и акклиматизировались в лабораториях в течение 10 дней перед началом эксперимента. Животных содержали в клетках микроизолятора, по пять на клетку с 12-часовым циклом свет/темнота. Животные без ограничения получали фильтрованную муниципальную воду Birmingham и стерилизованное белковое питание для грызунов Teklad Global 16% (2016S, Harlan Laboratories, Inc). Никакие потребляемые обогащения не предоставлялись. Рулоны бумаги Enrich-n'Nest (the Andersons Lab Bedding Products, Maumee, OH) были представлены в каждой клетке в качестве манипуланда. Клетки заменяли два раза в неделю. За животными наблюдали ежедневно и отмечали клинические признаки.

##### Опухолевая модель

Каждой мышке имплантировали SC вблизи правого фланга 30-40 мг фрагмента опухоли молочной железы человека MX-1 из пассажа *in vivo* с



использованием иглы 13 размера. День имплантации фрагментов опухоли был обозначен как день 0. Отдельные опухоли у 120 животных выросло до 100-245 мг по массе (100-245 мм<sup>3</sup> в размере) в день начала лечения, 10-й день после имплантации фрагментов опухоли. Те животные, которые были отобраны с опухолями с размерами в соответствующем диапазоне, были распределены на двенадцать групп лечения таким образом, чтобы средние и средние массы опухолей во всех группах в первый день лечения были как можно ближе друг к другу, насколько это возможно (средние массы опухолей находились в диапазоне от 160 до 168 мг, средние массы опухолей составляли 153 или 162 мг).

#### Хранение лекарственных препаратов

Флакон с порошком E7389 (Эрибулинмесилат, 10,1 мг) получили от Eisai Inc. замороженным (поставляется в сухом льду) и хранили при температуре ниже -70°C в темноте на десиканте после получения. Эверолимус (> 99%, № по каталогу E4040) был приобретен у LC Laboratories и хранился при -20°C после получения. Метилсульфоксид DriSolv<sup>®</sup> (ДМСО, безводный, № по каталогу MX 1457-7) был приобретен у EMD Chemicals, Inc., и хранился при комнатной температуре после получения. После того, как флакон с ДМСО был открыт, его хранили при комнатной температуре в атмосфере азота. Физиологический раствор (физиологический раствор, стерильный, без консервантов, для использования для животных только) и вода для инъекций, USP (WFI, стерильная-непирогенная, для использования для животных только) были изготовлены Nova-Tech, Inc., и хранились при комнатной температуре. В течение периода составления, физиологический раствор и WFI хранили при 4°C. Метилцеллюлоза (МС, вязкость 2%-го водного раствора 4000 сП при 20°C) была приобретена у фирмы Sigma-Aldrich и хранилась при комнатной температуре. Полисорбат 80 (Т80, Fisher Scientific), хранили при комнатной температуре. Раствор 0,5% МС /0,2% Т80 в WFI хранили при 4°C.

#### Технология приготовления лекарственного средства

Стоковый раствор 2,4 мг/мл E7389 в 100% ДМСО составляли путем добавления 4,21 мл 100% ДМСО (из неоткрытой бутылки) во флакон с 10,1 мг E7389 и растворения E7389 в 100% ДМСО осторожным встряхиванием. Раствор оставляли стоять в течение 2-3 минут, чтобы убедиться, что он полностью растворился. 2,4 мг/мл стокового раствора разделяли на аликвоты для всех 4 дней лечения, воздух во флаконах с аликвотами и в оставшемся 2,4 мг/мл стоковом растворе заменяли азотом, и ампулы с аликвотами и оставшимся раствором замораживали на уровне ниже  $-70^{\circ}\text{C}$ . В каждый день лечения аликвоту оттаивали при комнатной температуре и разводили физиологическим раствором с получением концентрации 0,06 мг/мл в 2,5% ДМСО/ 97,5% физиологического раствора. Более низкие концентрации 0,04 и 0,02 мг/мл достигали путем разбавления части раствора 0,06 мг/мл 2,5% ДМСО/97,5% физиологического раствора. Бутылки с дозирующими растворами хранили при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  между приготовлением и введением.

100% ДМСО разделяли на аликвоты для каждого дня лечения, воздух во флаконах замещали азотом и ампулы замораживали при температуре ниже  $-70^{\circ}\text{C}$ . В каждый день лечения аликвоту ДМСО оттаивали при комнатной температуре и разводили физиологическим раствором с получением 2,5% ДМСО/97,5% физиологический раствор. Этот раствор использовали для лечения мышей в группе 1 (носитель E7389).

Был составлен 0,5% МС/0,2% Т80 в WFI, и раствор хранили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Эверолимус в концентрации 4 мг/мл составляли на каждый день лечения в 0,5% МС/0,2% Т80 в WFI. Часть мутного раствора 4 мг/мл разбавляли 0,5% МС /0,2% Т80 в WFI до 2 мг/мл. Бутылки с дозирующими растворами хранили при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  между приготовлением и введением.

Все дозирующие растворы E7389, дозирующие растворы эверолимуса, а также носитель вводили мышам в соответствии с точной массой конкретного животного в каждый день лечения, с объемом впрыска, составляющим 0,1 мл/10 г массы тела.

## Фармакотерапия

Эксперимент состоял из контрольной группы, получавшей наполнитель, и одиннадцати группы, получавших лекарственное средство, по 10 мышей в каждой группе, в общей сложности 120 мышей в первый день лечения. Все процедуры начинались в 10-й день. E7389 вводили внутривенно (IV), один раз в четыре дня в общей сложности четырех инъекций (Q4Dx4; дни 10, 14, 18 и 22, также упоминается как Q4Dx4 (10) - (0) на всех фигурах) в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекцию сам по себе (группы 2-4, соответственно), а также в комбинации с эверолимусом (группы 7-12).

Эверолимус вводили перорально через зонд (PO) один раз в день в течение 16 последовательных дней (Q1Dx16; дни 10-25, также упоминается как Q1Dx16 (10) - (6), на всех фигурах) в дозах 40 и 20 мг/кг/доза сам по себе (группы 5 и 6, соответственно), а также в комбинации с E7389 (группы 7-12). В те дни, когда вводили оба соединения, E7389 вводили первым во всех комбинационных группах [- (0)] (инъекции начинали в 10:05, 8:45, 8:40 и 8:32 утра в дни 10, 14, 18, и 22, соответственно) с последующим введением эверолимуса через шесть часов [- (6)]. В те дни, когда только вводили эверолимус, лечение проводили во второй половине дня (от 1:15 до 2:45 вечера), за исключением 15-го дня, когда лечение начинали в 11:11 утра. Контрольная группа (группа 1) получала носители E7389 и эверолимуса (2,5% ДМСО/97,5% солевого раствора, IV, Q4Dx4 и 0,5% МС/0,2% Т80 в WFI, PO, Q1Dx16, соответственно).

## Измерение опухолей и массы организмов

Животных осматривали один раз в день на предмет смертности и заболеваемости. Опухоли SC измеряли, и животных взвешивали дважды в неделю, начиная с первого дня лечения, дня 10 после имплантации фрагмента опухоли. Объем опухоли определяли путем измерения штангенциркулем (мм) и используя формулу для эллипсоидной сферы:  $l \times w^2 / 2 = \text{мм}^3$ , в которой l и w относятся к большему и меньшему перпендикулярным размерам, полученным при каждом измерении. Эта формула также используется для расчета массы

опухоли, принимая за единицу плотности ( $1 \text{ мм}^3=1 \text{ мг}$ ). Предел обнаружения опухолей составлял  $4 \times 4 \text{ мм}$  (32 мг).

#### Продолжительность исследования

Исследование было прекращено в день 62 после имплантации фрагмента опухоли. Любое животное, чья опухоль достигала 4000 мг по массе, или изъязвленное, или любое животное, чья масса тела опускалась ниже 14 г, умерщвляли до запланированного дня окончания исследования по гуманным соображениям.

#### Оцениваемые параметры

Рассчитывали число неспецифических смертей, число полных регрессий опухоли, число безопухолевых выживших на день 62, и срединное количество дней для опухолей в каждой группе, за которые опухоли достигали четырех удвоений массы. Среднее время для достижения четырех удвоений массы опухоли использовали при расчете общей задержки в росте срединной опухоли (Т-С, дни). Сравнение массы срединной опухоли в группах лечения (Т) к массе срединной опухоли в контрольной группе ( $T/C \times 100\%$ ) на день 34 (последний день сбора данных, когда более чем 50% животных все еще живы в контрольной группе) использовали для дополнительной оценки противоопухолевой эффективности. Кроме того, для каждой группы рассчитывали изменение в группе средней массы тела на каждый день сбора данных по отношению к группе средней массы тела на 10-й день (в граммах и в виде процентов).

#### Анализ данных

Измерения индивидуальных опухолей и массы тела получали и обрабатывали с помощью программного обеспечения ADAS (автоматизированная система сбора данных), разработанного в Southern Research Institute. Программное обеспечение SigmaPlot  $\square$  9.0 было использовано для графического представления данных массы тела и опухоли. Статистическое программное обеспечение SigmaStat версии 3.5 было использовано для статистического сравнения данных роста опухоли. Различие между группами

считали значимым, если значение  $P$  было равно или меньше, чем 0,05. Время отдельного животного для достижения четырех удвоений массы опухоли было использовано в качестве конечной точки в анализе таблицы смертности (анализ Каплана-Мейера выживания с последующим логарифмическим ранговым критерием). Анализ таблицы жизни позволяет сравнивать данные роста между группами с использованием животных, у которых опухоль не достигает точки оценки, путем их фильтрации. Массы опухолей отдельных животных на день 62 для трех групп, получавших E7389 в дозе 0,6 мг/ кг/ инъекцию (отдельно или в сочетании с эверолимусом), на 52 день для трех групп, получавших E7389 в дозе 0,4 мг/ кг/ инъекцию, и на 41 день для трех групп, получавших E7389 в дозе 0,2 мг/ кг/ инъекцию сравнивали с помощью  $t$ -теста (или критерия суммы Манна-Уитни ранг). Непараметрический тест был использован, когда набор данных не соответствовал тесту нормальности. День, выбранный для анализа, представлял собой последний день сбора данных, когда, по меньшей мере, 50% животных были живы во всех трех группах.

#### Результаты

Опухоли в контрольной группе, получавшей носитель (группа 1), хорошо росли у всех десяти мышей. Одна опухоль была изъязвлена до достижения четырех удвоений массы опухоли. Срединная опухоль достигала четырех удвоений массы опухоли за 18,2 дней и достигала по массе 4,513 мг на день 34. Животные прибавляли по массе в течение эксперимента.

Внутривенное введение E7389 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/ кг/ инъекция по схеме Q4Dx4 (группы 2, 3, и 4, соответственно) переносилось без смертельных случаев, связанных с лечением. Лечение ассоциировалось с максимальной средней потерей массы тела 1% (0,2-0,3 г), когда E7389 вводили в дозах 0,6 и 0,4 мг/ кг/ инъекция, соответственно, в то время как введение в дозе 0,2 мг/ кг/ инъекция не приводило к потере средней массы тела. Таким образом, максимальная переносимая доза (MTD, определяемая как доза, которая не приводит к смерти более чем 10% животных в группе или не производит более

20% средней потери массы тела) E7389 при введении IV по схеме Q4Dx4 не была достигнута в этом эксперименте. IV-лечение с E7389 при дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/ инъекция был очень эффективно при ингибировании роста ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1. Опухоли шести из десяти животных в группе, получавшей дозу 0,6 мг/кг/инъекция, подверглись полной регрессии и пять животных были без опухолей на день окончания исследования. Срединные задержки роста опухоли в группах, обработанных дозами 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция составляли 33,8, 17,7 и 6,3 дней, соответственно. Величины Т/С на день 34 составляли 0%, 13% и 51%, соответственно. Было обнаружено, что рост опухолей в группах, получавших E7389 при дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция, статистически отличался от роста опухолей в контрольной группе, при сравнении времен у отдельных животное для достижения четырех удвоенной опухолевой массы (Группа 1 vs. Группа 2:  $P < 0,001$ , Группа 1 vs. Группа 3:  $P < 0,001$ , Группа 1 vs. Группа 4:  $P = 0,001$ ). Изменение средних масс тела животных, получавших E7389 в течение эксперимента, представлены графически на фиг.1. Ответ SC-имплантированных фрагментов опухоли молочной железы человека MX-1 на лечение E7389 представлена графически на фигуре 2 (средняя масса опухоли).

Пероральное введение эверолимуса в дозах 40 и 20 мг/ кг/ доза на Q1 график Dx16 (группы 5 и 6, соответственно) переносилось без смертельных случаев, связанных с лечением. Лечение дозой 40 мг/кг/доза ассоциировалось с максимальной потерей средней массы тела на 8% (1,8 г), наблюдаемой в день 24. Четыре животных в группе, получавших дозу 20 мг/кг/доза, умерло к 21-му дню. Эти смерти возникли в результате затопления клетки в ночь перед этим (эти животные были исключены из всех расчетов роста опухоли). Лечение дозой 20 мг/кг/доза было ассоциировано с максимальной потерей средней массы тела в 2% (0,4 г), наблюдаемой на 20-й день. Таким образом, МПД эверолимуса при введении PO по схеме Q1Dx16 не была достигнута в этом эксперименте. Было отмечено, что все животные в обеих группах имели сухую кожу, начиная с 20-го

дня. К 31 дню кожа выглядела нормальной. РО лечение с эверолимусом в обеих испытуемых дозах было минимально эффективным при ингибировании роста ксенотрансплантатов опухоли молочных желез МХ-1, вызывая срединные задержки опухолевого роста в 6,1 и 4,0 дней, соответственно. Величины Т/С на день 34 были 46% и 74%, соответственно. Рост опухолей в группах, получавших эверолимус в дозах 40 и 20 мг/кг/доза, как было обнаружено, статистически отличался от роста опухолей в контрольной группе, при сравнении времени для отдельного животного достижения четырех удвоений опухолевой массы (Группа 1 vs. Группа 5:  $P < 0,001$ , Группа 1 vs. Группа 6:  $P = 0,019$ ). Изменение средней массы тела животных, получавших эверолимус, в течение эксперимента представлены графически на фигуре 3. Ответ SC-имплантированных фрагментов опухоли молочной железы человека МХ-1 на лечение эверолимусом представлен графически на фигуре 4 (средние массы опухолей).

Введение E7389 IV по схеме Q4Dx4 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг /кг/инъекция плюс эверолимус РО по схеме Q1 Dx16 в дозе 40 мг/кг/доза (группы 7, 8, и 9, соответственно) переносилось без смертельных случаев. Одно животное в группе, получавшей лечение E7389 в дозе 0,6 мг/кг/инъекция плюс эверолимус в дозе 40 мг/кг/ доза, усыпили на 24 день из-за чрезмерной потери массы тела. Это рассматривалось как эвтаназия, связанная с лечением. Комбинированные способы лечения были связаны с максимальными средними потерями массы тела 9% (2,1 г), 5% (1 0,2 г) и 8% (1 +0,8 г), когда E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекцию, соответственно. Таким образом, МПД E7389 при введении IV по схеме Q4Dx4 в сочетании с эверолимусом, вводимым РО по схеме Q1Dx16, не была достигнута в этом эксперименте. Было отмечено, что животные во всех трех группах имели сухую кожу, начиная с 20-й день. Степень сухости кожи оказалась меньше, чем показано для 5-й группы (эверолимус в дозе 40 мг/кг/доза) в одиночку. К 27-му дню состояние кожи улучшилось. Комбинированные процедуры демонстрировали дозозависимую противоопухолевую активность, вызывая срединные задержки опухолевого роста  $> 33,8$ ,  $30,0$ , и  $13,4$  дней в

группах, в которых E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция, соответственно. Опухоли девяти и четырех животных в группах, в которых E7389 вводили в дозах 0,6 и 0,4 мг/кг/инъекция, соответственно, подверглись полной регрессии, и четыре и два животных, соответственно, не имели опухолей на день окончания исследования. Величины Т/С в комбинированных группах, в которых E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/ инъекции в день 34, составляли 0%, 2% и 19%, соответственно. Рост опухолей во всех трех комбинированных группах статистически отличался от роста опухолей в контрольной группе ( $p < 0,001$  для всех трех групп), при сравнении времени для отдельного животного достижения четырех удвоений опухолевой массы.

Сравнивали рост опухолей в группе комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,6 мг/кг/инъекция, статистически не отличался от роста опухолей в группе, получавших только E7389, когда времена отдельных животных, чтобы достичь четырех опухолевой массы удвоений (Группа 2 vs. опухолевые веса  $P=0,285$ ) и отдельных животных на день 62 (Группа 2 vs. Группа 7:  $P=0,567$ ). В то время как рост опухолей в группе комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,4 мг/кг/инъекция, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавших только E7389, при сравнении времени для отдельного животного достижения четырех удвоений опухолевой массы (Группа 3 vs. Группа 8:  $P=0,032$ ), различие не достигало того, чтобы быть значимым, когда сравнивали массы опухолей отдельных животных на 52 день (Группа 3 vs. Группа 8:  $P=0,083$ ). Противоопухолевая активность этой комбинированной терапии была больше, чем аддитивная по сравнению с противоопухолевой активностью, полученной путем введения каждого соединения по отдельности: срединная задержка роста опухоли в группе 3 (E7389 только в дозе 0,4 мг/кг/инъекции)=17,7 дней, срединное значение задержки роста опухоли в группе 5 (только эверолимус в дозе 40 мг/кг/доза)=6,1 дней по сравнению со срединным значением задержки роста опухоли в группе 8 (E7389 в дозе 0,4 мг/кг/инъекции плюс эверолимус в дозе 40 мг/кг/доза)=30,0 дней. Рост опухолей в группе



комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,2 мг/кг/инъекция, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавших только E7389, при сравнении для отдельных животных времени достижения четырех удвоенной опухолевой массы (Группа 4 vs. Группа 9:  $P < 0,001$ ) и массы опухолей отдельных животных на 41 день (группа 4 vs. группа 9:  $P < 0,001$ ). Противоопухолевая активность комбинированного лечения была аддитивной по сравнению с противоопухолевой активностью, полученного путем введения каждого соединения по отдельности: срединное значение задержки роста опухоли в группе 4 (E7389 только в дозе 0,2 мг/кг/инъекция)=>6,3 дней, т.е. срединное значение задержки роста опухоли в группе 5 (эверолимус только в дозе 40 мг/кг/доза)=6,1 дней по сравнению со срединным значением задержки роста опухоли в группе 9 (E7389 в дозе 0,2 мг/кг/инъекция плюс эверолимус в дозе 40 мг/кг/доза)=13,4 дней.

Введение E7389 IV по схеме Q4Dx4 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг /кг/инъекцию плюс эверолимус PO на графике Q1 Dx16 в дозе 20 мг/кг/доза (группы 10, 1: 1, и 12, соответственно) переносилось без летальных случаев. Комбинированные способы лечения ассоциировались с максимальной средней потерей массы тела 1% (0,3 г), 2% (0,4 г) и 3% (0,8 г), когда E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция, соответственно. Было отмечено, что животные во всех трех группах имели сухую кожу, начиная с 20-го дня. Степень сухости кожи оказалась меньшей, чем наблюдалось в группе 6 (эверолимус только в дозе 20 мг/кг/доза). Комбинированные процедуры лечения демонстрировали дозозависимую противоопухолевую активность, вызывая срединные значения задержки опухолевого роста > 33,8, 25,1 и 12,9 дней в группах, в которых E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция, соответственно. Опухоли восьми и одного животных в группах, в которых E7389 вводили в дозах 0,6 и 0,4 мг/кг/инъекция, соответственно, подверглись полной регрессии, и одно животное в каждой группе не имело опухолей на день окончания исследования. Величины T/C в группах комбинированного лечения, в которых E7389 вводили в дозах 0,6, 0,4 и

0,2 мг/кг/инъекция, в день 34 составляли 0%, 3% и 23%, соответственно. Рост опухолей во всех трех группах комбинированного лечения статистически отличался от роста опухолей в контрольной группе ( $p < 0,001$  для всех трех групп), при сравнении для отдельного животного времени достижения четырех удвоений опухолевой массы.

Рост опухолей в группе комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,6 мг/кг/инъекция, статистически не отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении для отдельного животного времени достижения четырех удвоений опухолевой массы (Группа 2 vs. Группа 10:  $P=0,985$ ) и отдельных животных на день 62 (группа 2 vs. Группа 10:  $P=0,161$ ). Хотя рост опухолей в группе комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,4 мг/кг/инъекция, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении для отдельного животного времени достижения четырех удвоений опухолевой массы (Группа 3 vs. Группа 11;  $P=0,05$ ), разница не достигла значения, когда сравнивали массы опухолей отдельных животных на 52 день (группа 3 vs. Группа 11;  $P=0,180$ ). Противоопухолевая активность этой комбинированной терапии была больше, чем аддитивная по сравнению с противоопухолевой активностью, полученной путем введения каждого соединения по отдельности: срединное значение задержки роста опухоли в группе 3 (E7389 только в дозе 0,4 мг/кг/инъекция)=17,7 дней, срединное значение задержки роста опухоли в группе 6 (эверолимус только в дозе 20 мг/кг/доза)=4,0 дней, по сравнению со срединным значением задержки роста опухоли в группе 11 (E7389 в дозе 0,4 мг/кг/инъекция плюс эверолимус в дозе 20 мг/кг/доза)=25,1 дней. Рост опухолей в группе комбинированной терапии, в которой E7389 вводили в дозе 0,2 мг/кг/инъекция, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении для отдельного животного времени достижения четырех удвоений опухолевой массы (Группа 4 vs. Группа 12:  $P < 0,001$ ) и массы опухолей отдельных животных на 41 день (группа 4 vs. группы

9:  $P=0,029$ ). Противоопухолевая активность этой комбинированной терапии была аддитивной по сравнению с противоопухолевой активностью, полученной путем введения каждого соединения по отдельности: срединное значение задержки роста опухоли в группе 4 (E7389 только в дозе 0,2 мг/кг/инъекции) $\Rightarrow$ 6,3 дней, т.е. срединное значение задержки роста опухоли в группе 6 (только эверолимус в дозе 20 мг/кг/доза) $=$ 4,0 дней по сравнению с срединным значением задержки роста опухоли в группе 12 (E7389 в дозе 0,2 мг/кг/инъекция плюс эверолимус в дозе 20 мг/кг/доза) $=$ 12,9 дней. Изменение средней массы тела животных, получавших E7389 в трех дозах в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/дозу в течение ходе эксперимента, представлены графически на фиг.5 и 6, соответственно. Ответ SC-имплантированных фрагментов опухоли молочной железы человека MX-1 на лечение E7389 в дозе 0,6, 0,4 или 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с двумя дозами эверолимуса представлен графически на фигуре 7, фигуре 8, и фигуре 9, соответственно (средняя масса опухоли).

### Заключение

Рост ксенотрансплантатов опухоли молочной железы человека MX-1 был чувствительным к лечению E7389 при введении IV по графику Q4Dx4 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция, что приводило к статистически достоверному ингибированию роста опухоли во всех трех группах. Введение E7389 в дозе 0,6 мг/кг/инъекция привело к шести полным регрессии опухолей и пяти выживших без опухолей. Введение эверолимуса PO в дозах 40 и 20 мг/кг/доза по схеме Q1Dx16 приводило к минимальному, но статистически значимому ингибированию роста опухоли при обеих испытываемых дозах. Лечение E7389 в дозах 0,6, 0,4 и 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/дозу переносилось и приводило к статистически значимому ингибированию роста ксенотрансплантатов опухоли молочной железы MX-1.

Рост опухолей в двух группах комбинированной терапии, в которых E7389 вводили в дозе 0,6 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20

мг/кг/доза, статистически не отличался от роста опухолей в группах, получавших только E7389, на основании времен достижения для отдельных животных четырех удвоений опухолевой массы и опухолевой массы отдельных животных на день 62. Хотя рост опухолей в группах, в которых E7389 вводили в дозе 0,4 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении для отдельного животного времен достижения четырех удвоений опухолевой массы, различие не достигало того, чтобы быть значимым, при сравнении массы опухолей отдельных животных на 52 день. Противоопухолевая активность обоих комбинированных терапий была больше, чем аддитивная по сравнению с противоопухолевой активности при введении каждого соединения по отдельности. Рост опухолей в двух группах, в которых E7389 вводили в дозе 0,2 мг/кг/инъекция в сочетании с эверолимусом в дозе 40 или 20 мг/кг/доза, статистически отличался от роста опухолей в группе, получавшей только E7389, при сравнении для отдельного животного времен достижения четырех удвоений опухолевой массы и массы опухоли отдельных животных на 41 день. Противоопухолевая активность обоих комбинированных терапий была больше, чем аддитивная по сравнению с противоопухолевой активности при введении каждого соединения по отдельности.

Введение эверолимуса приводило к временной сухости кожи животных (например, сухость кожи не была отмечена в контрольной или не получавшей E7389 группах). Степень сухости кожи во всех комбинационных группах оказалась меньше, чем наблюдалась в группах, получавших только эверолимус.

## Пример 2

### Способы

#### Антипролиферационный анализ

Ниже описаны способы, с помощью которых проводили высокопропускные скрининги для экспериментов, описанных в данном примере.

Клетки оттаивают из состояния консервации в жидком азоте. Скрининг

начинали после того, как клетки размножились и поделились в течение ожидаемого их времени удвоения. Клетки засевают в среды роста в 384- и 1536-луночные планшеты, обработанные для культуры тканей. Клетки уравнивают в планшетах для анализа с помощью центрифугирования и помещают в инкубаторы, подсоединенные к дозирующим модулям, при 37 °С в течение двадцати четырех часов до начала лечения. Во время обработки получают набор аналитических планшетов (которые не подвергались обработке) и уровни АТФ измеряют путем добавления ATPLite (Perkin Elmer). Эти планшеты Tzero (T0) считывают с помощью ультрачувствительный люминесценции с использованием планшетных ридерах Envision. Обработанные аналитические планшеты инкубируют с соединением в течение семидесяти двух часов. После семидесяти двух часов планшеты обрабатывали для анализа конечных точек с помощью ATPLite. Все экспериментальные точки получают с помощью автоматизированных процессов, контролируют качество и анализируют с использованием программного обеспечения. Аналитические планшеты принимаются, если они проходят следующие стандарты контроля качества: относительные значения люциферазы согласуются на протяжении всего эксперимента, оценки Z-фактора больше, чем 0,6, и необработанные контроли/контроли с носителем поступают последовательно на планшете. Расчет для синергической оценки приводится ниже.

Ингибирование роста (GI) используется в качестве меры жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток с носителем измеряют во время дозирования (T0) и после семидесяти двух часов (T72). Значение индекса GI 0% означает отсутствие ингибирования роста, т.е. сопоставляют сигналы клеток, обработанных соединением и носителем T72. GI 100% представляет собой полное ингибирование роста, т.е. сопоставляют сигналы клеток, обработанных соединением и носителем T0. Количество клеток не увеличилось в течение периода обработки в лунках с GI 100%, и можно предложить цитостатическое действие для соединений, достигающих плато на этом уровне

эффекта. GI 200% представляет собой полную гибель всех клеток в культуральной лунке. Соединения, достигающие плато активности GI 200% считаются цитотоксическими. GI рассчитывается путем применения следующего теста и уравнения:

$$\begin{aligned} \text{если } T < V_0 &: 100 * \left(1 - \frac{T - V_0}{V - V_0}\right) \\ \text{если } T \geq V_0 &: 100 * \left(1 - \frac{T - V_0}{V - V_0}\right) \end{aligned}$$

где T представляет собой уровень сигнала для тестируемого образца, V представляет собой уровень обработанного носителем контроля, а  $V_0$  представляет собой уровень контроля с носителем в нулевой момент времени. Эта формула получена из расчета ингибирования роста, используемого в высоко пропускном скрининге NCI-60 Национального института рака. Все анализы данных отдельных средств и комбинаций выполняют по ингибированию роста.

#### Анализ показателя синергии

Для измерения комбинационных эффектов сверх аддитивности Леве, используется скалярная мера для характеристики силы синергического взаимодействия, называемая Балльной оценкой Синергии. Балльная оценка Синергии рассчитывается как:

$$\text{Балльная оценка синергии} = \log \square_x \log \square_y \square \max(0, I_{\text{data}})(I_{\text{data}} - I_{\text{ЛеВе}})$$

Фракционное ингибирование для каждой точки компонентного средства и комбинации в матрице рассчитывается по отношению к среднему значению всех обработанных носителем контрольных лунок. Уравнение Балльной оценки Синергии интегрирует экспериментально наблюдаемую величину активности в каждой точке в матрице сверх модельной поверхности, численно производной от активности компонентных веществ с использованием модели Леве для аддитивности. Дополнительные условия в уравнении Балльной оценки Синергии (выше) используются для нормализации различных факторов разбавления, используемых для отдельных веществ, и для обеспечения возможности сравнения балльных оценок синергии во всем эксперименте. Включение селекции положительного ингибирования или мультипликатора  $I_{\text{data}}$  удаляет

шум вблизи уровня нулевого эффекта и смещает результаты для синергических взаимодействий, при этом происходящие при высоких уровнях активности.

Смещение эффективности оценивается с помощью изоболограммы, которая демонстрирует, на сколько меньше требуется лекарственного средства в комбинации для достижения желаемого уровня эффекта по сравнению с дозой отдельного средства, необходимой для достижения этого эффекта. Изоболограмма рисуется путем выявления локуса концентраций, которые соответствуют пересечению указанного уровня ингибирования. Это осуществляют путем нахождения точки пересечения для концентрации каждого отдельного средства в матрице дозы через концентрацию другого отдельного средства. Практически, каждая вертикальная концентрация  $CY$  удерживается неподвижной, в то время как бисекционный алгоритм используется для идентификации горизонтальной концентрации  $CX$  в сочетании с той же вертикальной дозой, которая дает выбранный уровень эффекта в поверхности отклика  $Z(CX, CY)$ . Эти концентрации затем соединяют с помощью линейной интерполяции для создания отображения изоболограммы. Для синергических взаимодействий контур изоболограммы опускается ниже порога аддитивности и приближается к началу координат, а антагонистическое взаимодействие будет лежать выше порога аддитивности. Планки погрешностей представляют неопределенность, вытекающую из отдельных точек данных, используемых для генерации изоболограммы. Неопределенность для каждой точки пересечения оценивается от ошибок ответа с использованием деления пополам для нахождения концентраций, где  $Z - \sigma Z(CX, CY)$  и  $Z + \sigma Z(CX, CY)$  пересекают  $I_{cut}$ , причем  $\sigma Z$  представляет собой стандартное отклонение остаточной ошибки по шкале эффекта.

#### Анализ балльной оценки Объема Леве

Объем Леве используется для оценки общей величины комбинированного взаимодействия сверх модели аддитивности Леве. Объем Леве особенно полезен при различении синергического увеличения фенотипической активности

(положительный Объем Леве) и синергетических антагонизмов (отрицательный Объем Леве). При обнаружении антагонизма следует оценить Объем Леве, чтобы изучить, существует ли какая-либо корреляция между антагонизмом и активностью конкретного лекарственного препарата с мишенью или клеточным генотипом. Эта модель определяет аддитивность как несинергетическое комбинационное взаимодействие, где поверхность матрицы комбинаций дозы должна быть неотличима от другого препарата, перекрещенного с самим собой.

Расчет для аддитивности представляет собой:

$$I_{\text{Леве}}, \text{ который удовлетворяет } (X/X_I) + (Y/Y_I) = 1$$

где  $X_I$  и  $Y_I$  представляют собой эффективные концентрации отдельных средств для наблюдаемого комбинационного эффекта  $I$ . Например, если 50% ингибирования по отдельности достигается от 1  $\mu\text{M}$  лекарственного препарата А или 1  $\mu\text{M}$  лекарственного препарата В, комбинация 0,5  $\mu\text{M}$  А и 0,5  $\mu\text{M}$  В также должна ингибировать на 50%.

Активность, наблюдаемая сверх аддитивности Леве, определяет потенциальное синергетическое взаимодействие. Для настоящего анализа эмпирически полученные комбинированные матрицы сопоставляли с соответствующими моделями аддитивности Леве, построенными из экспериментально полученных кривых ответа на дозы отдельных средств. Любая активность, наблюдаемая после вычитания модели аддитивности из матрицы дозового ответа, свидетельствует о синергии (Фигура 10). Отрицательный Объем Леве является показателем антагонизма. Суммирование этого избытка аддитивности в матрице дозового ответа называется объемом Леве.

### Результаты

Анализ ответа на дозу одного средства

Эрибулин имел различные активности по всей панели двадцати пяти клеточных линий. Активность отдельного средства оценивали с использованием трехкратного, десятикратного титрования дозы. Двадцать три клеточные линии



оценивали в формате 1536-луночного планшета. Две дополнительные линии клеток оценивали в формате 384-луночного планшета. Для клеточных линий, у которых  $GI_{50}$  достигли уровней ингибирования более пятидесяти процентов, средний показатель  $GI_{50}$  составлял 0,51 нМ (Фиг. 11).

#### Дизайн комбинационного скрининга

Данные комбинационного анализа получали в виде матрицы доз  $6 \times 6$  (Фигура 12). Двадцать клеточных линий подвергали скринингу в формате 1536-луночного планшета, в то время как пять клеточных линий подвергали скринингу в формате 384-луночного планшета. Тридцать пять энхансерных соединений, в том числе ВКМ-120, комбинировали с энхансерной молекулой эрибулином по всей панели двадцати пяти клеточных линий. Кроме того, двенадцать соединений комбинировали в само-перекрестном анализе для каждой клеточной линии. Начальная концентрация для энхансии была сосредоточена на ЕС90 для эрибулина.

#### Анализ комбинационного скрининга на основе само-перекрестов

Для того, чтобы объективно установить критерии совпадения для анализа комбинационного скрининга, были выбраны двенадцать соединений для само-перекрестов по всей панели из двадцати пяти клеточных линий в качестве средств для эмпирического определения базового уровня аддитивного, несинергического ответа. Идентичность двенадцати само-перекрестных соединений определяли путем отбора соединений с множеством значений максимального ответа и скорости нарастания реакции на дозу отдельного средства. Те комбинации лекарственных средств, которые дали уровни эффектов, которые статистически превалировали над этими базовыми значениями аддитивности, считались синергическими.

Критерий Балльной оценки Синергии был использован для само-перекрестного анализа. Балльные оценки синергии само-перекрестов, как ожидается, являются аддитивными по определению, и, следовательно, поддерживают нулевую балльную оценку синергии. При этом, хотя некоторые

само-перекрестные Балльные оценки Синергии близки к нулю, многие из них больше нуля, что позволило предположить, что экспериментальный шум или неоптимальная подгонка кривой дозового ответа отдельного средства способствуют незначительным возмущениям в балльной оценке. Наложение само-перекрестных данных для панели двадцати пяти клеточных линий демонстрирует глобальный средний балл синергии 1,55. Глобальное среднее значение по всей панели клеточных линий дало само-перекрестную Балльную оценку Синергии 1,15, что предполагает минимальное влияние выпадающих значений. Учитывая потенциальные различия в чувствительности клеточных линий к активностям комбинаций эрибулина, мы решили использовать стратегию центрических клеточных линий для анализа комбинационного скрининга на основе само-перекрестов, сосредоточив внимание на само-перекрестном поведении в отдельных клеточных линиях в противовес глобальному обзору активности панели клеточных линий. Комбинации, где Балльная оценка Синергии больше среднего само-перекреста плюс два стандартных отклонения ( $2\sigma$ ) или три стандартных отклонений ( $3\sigma$ ), можно считать кандидатскими синергиями на уровне достоверности 95% и 99%, соответственно.

Были определены Балльные оценки Синергии, превышающие специфический для клеточной линии средний само-перекрестный пороговый уровень на  $2\sigma$  и  $3\sigma$ . Отсечки Объема Лече для клеточной линии также рассчитывали, исходя из расчета  $2\sigma$  и  $3\sigma$  выше среднего. На основе статистических само-перекрестных отсечек, данные фильтровали на комбинации лекарственных средств, демонстрирующих возможную синергию через панель клеточных линий. Данные комбинаций анализировали на клеточную линию, сравнения Объема Лече и Балльную оценку Синергии с соответствующими само-перекрестными отсечками, на  $2\sigma$  и  $3\sigma$  превышающими среднее. Любой объем Лече или Балльная оценка Синергии, большая или равная само-перекрестной отсечке, считались успехом.

## Эверолимус

Сигнальный путь фосфатидилинозитол 3-киназы (PI3K) является основным фактором клеточной пролиферации и отличительной чертой многих злокачественных новообразований человека. Нарушение регуляции PI3K-пути может являться способным к трансформации в силу конститутивной активации и, в конечном счете, стимуляции пролиферации клеток и подавления проапоптотической сигнализации. Эверолимус является аллостерическим ингибитором mTOR (TORC1) при IC50 1,6-2,4нМ. Как показано с помощью тепловой карты балльной оценки синергии (Фигура 13), хорошая широта комбинированной активности для эверолимуса наблюдается по всей панели клеточных линий. На фигуре 14 приведены значения балльной оценки синергии и оценки объема Лече для эверолимуса.

### Другие варианты осуществления

Несмотря на то, что изобретение было описано в связи с конкретными вариантами его осуществления, следует понимать, что возможны дополнительные модификации и данная заявка охватывает любые вариации, применения или адаптации изобретения, следующие, в общем плане, принципам изобретения и включающие такие отклонения от настоящего описания, которые находятся в пределах известной или обычной практики в данной области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным в данном документе.

Все публикации и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана как включенная в качестве ссылки во всей ее полноте.

## Формула изобретения

1. Способ лечения индивидуума, страдающего от или имеющего риск развития злокачественного новообразования, причем указанный способ включает введение индивидууму (I) эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли, и (II) ингибитора мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) или фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата или аморфного твердого вещества этого.

2. Способ по п.1, в котором указанный индивидуум является пациентом-человеком.

3. Способ по п.1, в котором указанному индивидууму поставлен диагноз злокачественного новообразования, он проходит лечение от злокачественного новообразования или находится в процессе восстановления после терапии от злокачественного новообразования.

4. Способ по п.1, в котором указанный злокачественное новообразование представляет собой первичную опухоль.

5. Способ по п.1, в котором указанный злокачественное новообразование представляет собой метастаз.

6. Способ по п.1, в котором указанный злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль.

7. Способ по п.1, в котором злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака легкого, рака яичника, рака эндометрия, рака глотки, рака пищевода и саркомы.

8. Способ по п.7, в котором указанный злокачественное новообразование выбрано из рака молочной железы и рака легкого.

9. Способ по п.1, в котором указанная фармацевтически приемлемая соль эрибулина является эрибулинмезилатом.

10. Способ по п.1, в котором указанный эрибулин или указанную его

фармацевтически приемлемую соль вводят путем внутривенной инфузии.

11. Способ по п.10, в котором внутривенную инфузию проводят в течение от примерно 1 до примерно 20 минут.

12. Способ по п.11, в котором внутривенную инфузию проводят в течение от примерно 2 до примерно 5 минут.

13. Способ по п.1, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве в интервале от примерно 0,1 мг/м<sup>2</sup> до примерно 20 мг/м<sup>2</sup>.

14. Способ по п.13, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве в интервале от примерно 1,1 мг/м<sup>2</sup> до примерно 1,4 мг/м<sup>2</sup>.

15. Способ по п.1, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в каждый из дней 1 и 8 из 21-дневного цикла, или каждый из дней 1 и 15 из 28-дневного цикла.

16. Способ по п.1, в котором указанный ингибитор mTOR выбран из группы, состоящей из эверолимуса, ридафоролимуса и темсиролимуса и фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов или аморфных веществ этого.

17. Способ по п.1, в котором указанный ингибитор mTOR является эверолимусом или фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом или аморфным веществом этого.

18. Способ по п.17, в котором указанный эверолимус или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят перорально.

19. Способ по п.18, в котором указанный эверолимус или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят в количестве, находящемся в диапазоне от примерно 0,1 мг до примерно 30 мг.

20. Способ по п.19, в котором указанный эверолимус или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят в

количестве примерно 10 мг.

21. Способ по п.1, в котором указанный ингибитор mTOR или указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят один раз в день в течение 21-дневного цикла или 28-дневного цикла.

22. Способ по п.1, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль, и указанный ингибитор mTOR или указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят, по существу, одновременно или последовательно.

23. Способ по п.22, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль вводят перед указанным ингибитором mTOR или указанной фармацевтически приемлемую солью, гидратом, сольватом или аморфным веществом этого.

24. Способ по п.1, в котором указанный эрибулин или указанную его фармацевтически приемлемую соль, и указанный ингибитор mTOR или указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого вводят в качестве единственных противораковых средств.

25. Способ по п.24, в котором указанная фармацевтически приемлемая соль эрибулина представляет собой эрибулинмезилат и/или указанным ингибитором mTOR является эверолимус.

26. Способ по п.1, в котором указанное лечение: (I) уменьшает число злокачественных клеток; (II) уменьшает объем опухоли; (III), увеличивает скорость регрессии опухоли; (IV) снижает или замедляет инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; (V) уменьшает или замедляет метастазирование опухоли; (VI) снижает или ингибирует рост опухоли; ((VII) предотвращает или задерживает возникновение и/или рецидив злокачественного новообразования и/или удлиняет время выживания без признаков заболевания и опухоли; (VIII), увеличивает общее время выживания; (IX) снижает частоту лечения; и/или (X) снимает один или более симптомов, связанных со злокачественным новообразованием.

27. Способ уменьшения размера опухоли у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму (I) эрибулина или его фармацевтически приемлемой соли и (II) ингибитора mTOR или фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата или аморфного вещества этого.

28. Способ по п.27, в котором указанный ингибитор mTOR является эверолимусом или фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом или аморфным веществом этого.

29. Набор для применения при лечении злокачественного новообразования или уменьшения размера опухоли, включающий (I) эрибулин или его фармацевтически приемлемую соль, и (II) ингибитор mTOR или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват или аморфное вещество этого.

30. Набор по п.29, в котором указанный ингибитор mTOR является эверолимусом или фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом или аморфным веществом этого.

31. Набор по п.29, в котором (I) эрибулин или указанная его фармацевтически приемлемая соль, и указанный (II) ингибитор mTOR или указанная фармацевтически приемлемая соль, гидрат, сольват, или аморфное вещество этого находится в лекарственной форме.