



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121311** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)

A61K 31/395 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 35/00
A61P 35/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

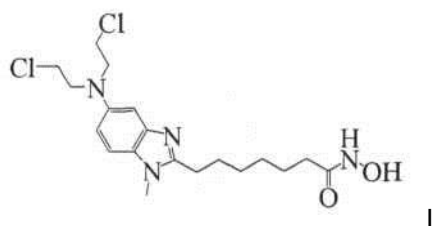
<p>(21) Номер заявки: а 2016 13401</p> <p>(22) Дата подання заявки: 26.03.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.05.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1409471.8</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 28.05.2014</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 12.06.2017, Бюл.№ 11</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2020, Бюл.№ 9</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2015/056667, 26.03.2015</p>	<p>(72) Винахідник(и): Мерлінг Томас (СН), Фестуча Клаудіо (ІТ)</p> <p>(73) Власник(и): ЕРО-СЕЛТІК С.А., 1, rue Jean Piret, L-2350, Luxembourg, Luxembourg (LU)</p> <p>(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013/113838 A1, 08.08.2013 WO 2010/085377 A2, 29.07.2010 WO 2013/040286 A2, 21.03.2013 WANG XIAO-RONG ET AL, "[Effect of histone deacetylase inhibitor NL101 on rat neurons].", MEDLINE, US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US, (201405), Database accession no. NLM24998648, XP002740556 [A] 1 * abstract * ZHEJIANG DA XUE XUE BAO. YI XUE BAN = JOURNAL OF ZHEJIANG UNIVERSITY. MEDICAL SCIENCES MAY 2014, (201405), vol. 43, no. 3, ISSN 1008-9292, pages 265 - 272 [A] 1 ZULKOWSKI K ET AL, "Regression of Brain Metastases from Breast Carcinoma after Chemotherapy with Bendamustine", JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, SPRINGER INTERNATIONAL, BERLIN, DE, (20020101), vol. 128, doi:10.1007/S00432-001-0303-4, ISSN 0171-5216, pages 111 - 113, XP003005594 [A] 1-54 * the whole document * CHAMBERLAIN MARC C, "Salvage therapy with bendamustine for methotrexate refractory recurrent primary CNS lymphoma: a retrospective case series.", JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY MAY 2014, (201405), vol. 118, no. 1, ISSN 1573-7373, pages 155 - 162, XP002740557 [A] 1-54 * the whole document *</p>
--	---

(54) СПОЛУКИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ МОЗКУ

(57) Реферат:

Запропонована сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль

UA 121311 C2



I

для застосування при лікуванні раку головного мозку, вибраного з MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, метастатичного раку головного мозку і первинної лімфоми ЦНС, і спосіб лікування вказаних типів раку у хворого, який потребує цього, що включає введення вказаному хворому сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується нових способів лікування раку головного мозку, який особливо стійкий до лікування, що застосовується в минулому, а саме способів лікування астроцитарних пухлин головного мозку, типів раку мозку, які являють собою типи метастатичного раку і типи первинної лімфоми ЦНС.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Рак є одним з найбільш небезпечних для життя захворювань. Рак являє собою стан, при якому в певній частині тіла відбувається неконтрольований ріст клітин. Згідно з останніми даними Американського товариства раку в США в 2014 р. виявлено 1,67 мільйони нових випадків раку. Рак є другою ведучою причиною смерті в Сполучених Штатах (другою тільки відносно захворювань серця), і, як підраховано, забрав більше 585000 життів в 2014 р. Фактично підраховано, що у 50% всіх чоловіків і 33% всіх жінок, які мешкають в Сполучених Штатах, буде розвиватися якийсь тип раку протягом їх життя. Тому рак є серйозним тягарем для суспільної охорони здоров'я і пов'язаний зі значними витратами в Сполучених Штатах. Ці дані відображають ситуацію в більшості інших країн по всьому світу, хоча типи раку і відносні співвідношення людей, у яких розвиваються різні типи раку, варіюються залежно від множини різних чинників, наприклад, включаючи генетику і раціон харчування.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я (ВООЗ) класифікує первинні пухлини головного мозку у вигляді чотирьох категорій. Клас I і II ВООЗ являють собою високодиференційовані гліоми, в той час як астроцитоми і олігодендрогліоми (клас III ВООЗ), а також гліобластоми (GBMs) (клас IV ВООЗ) в сукупності позначаються як злоякісні гліоми. Прогноз більшості первинних і вторинних пухлин головного мозку несприятливий через брак ефективних терапевтичних агентів. Вони є основною причиною смерті від солідних пухлин у дітей і третьою провідною причиною смерті від раку у підлітків і дорослих у віці 15-34 років (Jemal et al, CA Cancer J Clin 59 2009 225-249).

Серед злоякісних гліом GBMs є найбільш поширеними і фатальними новоутвореннями, становлячи приблизно 50% всіх гліом. GBM має невтішний прогноз, що свідчить про необхідність нових стратегій лікування. Хірургічне втручання з подальшим сумісним лікуванням алкілувальним агентом темозоломідом (TMZ) і променевою терапією є стандартним лікуванням хворих, які страждають на GBM. Основний механізм дії TMZ ініціюється аномальним метилуванням основ ДНК, особливо Об-метилгуаніну в ДНК (Verbeek et al, Br Med Bul, 85, 2008, 17-33). Однак багато хворих стійкі або дають тільки слабку реакцію на TMZ. Це, як показано, виникає внаслідок помилкової репарації (MMR), яка опосередковує Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазою (MGMT) (дивись Weller et al, Nat Rev Neurol, 6, 2010, 39-51). Хворі, що мають таку систему репарації, страждають на «MGMT-позитивні GBMs». Активація шляхів mTOR/DNAРКС також, як вважають, відіграє певну роль. До цього часу не розроблені хіміотерапевтичні агенти, які є активними проти MGMT-позитивних GBMs. Активність MGMT також має велике значення при інших астроцитарних пухлинах головного мозку, а саме дифузних астроцитомах (клас III ВООЗ) і анапластичних астроцитомах (клас III ВООЗ). Прогресія їх до GBMs опосередковується головним чином шляхом метилування за допомогою MGMT. Таким чином, можна бачити, що терапевтичний агент, який активний проти MGMT-позитивних астроцитом, буде бажаним для запобігання прогресії цих дифузних і анапластичних астроцитом до GBMs.

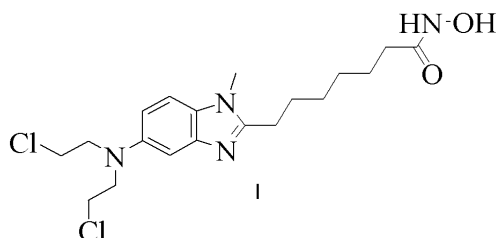
Тому надто важливо терміново розробити новий терапевтичний агент з відмінною протипухлинною активністю не тільки відносно MGMT-негативних GBMs, але і відносно MGMT-позитивних GBMs (а також інших астроцитарних пухлин головного мозку), який характеризується чудовим проникненням в ЦНС і має допустимий профіль токсичності.

Метастатична пухлина мозку починається як рак в інших місцях організму і поширюється в мозок. Рак молочної залози, легень, меланома, рак товстої кишки і нирок звичайно метастазує. Часто метастатична пухлина головного мозку виявляється до первинної пухлини. Метастатичні пухлини головного мозку є найбільш поширеними серед всіх пухлин головного мозку у дорослих. Підраховано, що вони можуть досягати до 170000 нових випадків кожний рік. Хоча прогноз трохи кращий, ніж у GBMs, прогноз метастатичного раку головного мозку звичайно є поганим. Знову застосовується поєднання хірургічного втручання, терапії і хіміотерапії з точним поєднанням в межах цих варіантів залежно від природи метастатичного раку і стадії розвитку (а також від стану здоров'я хворого). Хірургічне втручання (коли це можливо) і променева терапія являють собою стандартне застосування лікування. Іноді використовується хіміотерапія. На жаль, нічого з цього на сьогоднішній день не було особливо успішним. Частково це відбувається через потребу в хіміотерапевтичному агенті, що характеризується чудовим проникненням в ЦНС (а також, звичайно, і чудовою протипухлинною активністю і профілем переносимості

токсичності). Багато існуючих хімотерапевтичних агентів демонструють погане проникнення через гематоенцефалічний бар'єр. Існує гостра потреба в новому терапевтичному агенті для розв'язання цих проблем.

Первинна лімфома центральної нервової системи (ЦНС) бере початок з лімфоцитів, але повинна розглядатися як пухлина головного мозку через її локалізацію виключно в мозку і терапевтичних проблем, схожих з проблемами для інших пухлин головного мозку. Зокрема, доставка лікарських засобів порушується через гематоенцефалічний бар'єр, і токсичність для головного мозку обмежує використання сучасних методів лікування. Більшість первинних лімфом ЦНС являє собою дифузні В-клітинні лімфоми (приблизно 90%). Незважаючи на те, що вони відносно рідкі, їх частота і поширеність збільшується. У цей час медіана показника виживаності при існуючих схемах лікування становить 44 місяці. Для цього стану досі не існує ніякої особливо ефективної схеми лікування. У цей час переважний хімотерапевтичний агент являє собою метотрексат. Однак його проникнення через гематоенцефалічний бар'єр є незадовільним, і він повинен бути введений в дуже високих дозах. Спільне з променевою терапією лікування може поліпшити результати, але побічні ефекти можуть бути дуже серйозними. Існує, отже, потреба в поліпшеному хімотерапевтичному агенті, який має більшу здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр, а також показує чудову протипухлинну активність проти первинних лімфом ЦНС.

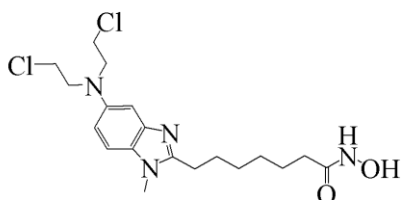
У патенті WO-A-2010/085377 розкривається сполука формули I, представлена нижче. Це перша в своєму класі гібридна молекула з подвійною функціональністю алкілювання-HDACi, яка істотно інгібує шлях HDAC.



Біологічні випробування показали, що сполука формули I ефективно інгібує ферменти HDAC класу 1 і класу 2 (наприклад, HDAC1 з IC_{50} 9 nM), і, як показано, має чудову активність *in vitro* відносно багатьох клітинних ліній мієломи. Крім того, вона придушує репарацію ДНК за допомогою значної негативної регуляції FANCD2, BRCA1, BRCA2 і TS (тимідилатсинтетази), що можливо пов'язано з інгібуванням HDAC6 і HDAC8. Аналіз на цитотоксичність в клітинних лініях NCI-60 показав, що вона має дуже сильну протипухлинну дію з медіаною величини IC_{50} 2,2 мкМ в порівнянні з 72 мкМ для бендамустину. У патент WO-A-2013/113838 включені дані, які демонструють активність сполуки формули I (що позначається в описі як NL-101) проти ряду клітинних ліній, включаючи деякі клітинні лінії гліобластоми. Однак незрозуміло, чи є кожна з цих клітинних ліній MGMT-негативною клітинною лінією пухлини GBM.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Відповідно до першого аспекту даного винаходу пропонується сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль:



для застосування при лікуванні раку головного мозку, вибраного з MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, метастатичного раку головного мозку і первинної лімфоми ЦНС.

У доклінічних дослідженнях *in vitro* і *in vivo* було показано, що сполука формули I активна не тільки відносно MGMT-негативних пухлин GBM, але і відносно MGMT-позитивних пухлин GBM. Виходячи з цього, можна також очікувати, що вона буде активна відносно інших MGMT-позитивних астроцитарних пухлин. Крім того, було виявлено, що сполука формули I здатна дуже добре проникати через гематоенцефалічний бар'єр, що робить її ідеальною для терапевтичного застосування не тільки проти MGMT-позитивних астроцитарних пухлин, але і проти інших пухлин мозку. Зокрема, додатково було виявлено, що вона має дуже хорошу активність відносно метастатичного раку головного мозку, а також первинної лімфоми ЦНС.

У другому аспекті даного винаходу пропонується застосування сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку головного мозку, вибраного з MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, метастатичного раку головного мозку і первинної лімфоми ЦНС.

У третьому аспекті даного винаходу запропонований спосіб лікування раку головного мозку, вибраного з MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, метастатичного раку головного мозку і первинної лімфоми ЦНС, у хворого, який потребує цього, що включає введення вказаному хворому сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1 являє собою графік залежності концентрації EDO-S101 (мкМ) від часу в спинномозковій рідині і від часу в крові;

Фігура 2 являє собою діаграму IC_{50} для дванадцяти клітинних тестованих ліній GBM після введення темозоломідом;

Фігура 3 являє собою діаграму IC_{50} для дванадцяти клітинних тестованих ліній GBM після введення темозоломідом і вориностату;

Фігура 4 являє собою діаграму IC_{50} для дванадцяти клітинних тестованих ліній GBM після введення бендамустину;

Фігура 5 являє собою діаграму IC_{50} для дванадцяти клітинних тестованих ліній GBM після введення бендамустину і вориностату;

На фігурі 6 представлена діаграма процента виживаності клітин залежно від концентрації EDO-S101 (мкМ) для кожної з дванадцяти клітинних тестованих ліній;

На фігурі 7a представлений графік залежності люмінесценції від часу як ступінь росту клітин GBM12 після введення;

На фігурі 7b представлений графік залежності процента виживаності від часу, що демонструє пролонгування виживаності у випадку EDO-S101 в порівнянні з бендамустиним і контролем;

На фігурі 8 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U251, яких лікували EDO-S101;

На фігурі 9 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U87, яких лікували EDO-S101;

На фігурі 10 представлений графік залежності частки тих, що виживають від дози променевої терапії (Гр) для клітин U251, U87 і T98G, які піддавались тільки променевій терапії, променевій терапії і 2,5 мкМ EDO-S101 (показано на фігурі як NL-101) і 5 мкМ EDO-S101 EDO-S101;

На фігурі 11 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U251, яких лікували контрольним впливом, променевою терапією і EDO-S101;

На фігурі 12 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U251, яких лікували контрольним впливом, променевою терапією і темозоломідом, EDO-S101 і променевою терапією, і EDO-S101;

На фігурі 13 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U87, яких лікували контрольним впливом, променевою терапією і EDO-S101;

На фігурі 14 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей, які несуть імплантовані пухлини U87, яких лікували контрольним впливом, променевою терапією і темозоломідом, EDO-S101 і променевою терапією, і EDO-S101;

Фігури 15 і 16 являють собою біоломінесцентні зображення мишей з ортотопічною трансплантацією лінії U251 GBM з трансфікованою люциферазою після лікування носієм, EDO-S101, темозоломідом і променевою терапією, і темозоломідом;

На фігурі 17 представлений графік залежності ймовірного часу до прогресії (TTP) (%) від часу для мишей з ортотопічною трансплантацією лінії U251 з трансфікованою люциферазою, після лікування носієм, EDO-S101, темозоломідом і променевою терапією, і темозоломідом;

На фігурі 18 представлений графік залежності процента виживаності від часу для мишей, які несуть імплантовані лімфоми ЦНС OCI-LY10, яких лікували контрольним впливом, бендамустином і EDO-S101; і

На фігурі 19 представлений графік залежності процента виживаності від часу для мишей, які несуть потрібний негативний раку молочної залози з метастазами в мозок після трансфекції клітин MB-468 раку молочної залози, яких лікували контрольним впливом, бендамустином і EDO-S101.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході використовується ряд загальних термінів і виразів, які потрібно інтерпретувати таким чином.

Астроцитарна пухлина головного мозку являє собою пухлину, яка походить із зірчастих клітин глії (астроцитів) в головному мозку. Вони діляться на високодиференційовані (клас I і II) і низькодиференційовані (клас III і IV). Астроцитарні пухлини класу II відомі як дифузні астроцитоми. Хоча вони ростуть порівняно повільно, вони можуть переродитися в злоякісні первинні пухлини. Астроцитарні пухлини класу III відомі як анапластичні астроцитоми. Вони являють собою злоякісні пухлини; вони ростуть більш швидкими темпами, і прагнуть до інвазії в сусідні здорові тканини. Астроцитарні пухлини класу IV відомі як мультиформні гліобластоми (GBM). Вони є надто злоякісними, швидко ростуть, легко поширюються в сусідні тканини і дуже важко піддаються лікуванню традиційними методами.

Поточним стандартом хіміотерапевтичного лікування є темозоломід (TMZ). Однак багато які хворі резистентні або лише слабо реагують на нього. Це, як показано, виникає внаслідок помилкової репарації (MMR), яка опосередковується O6-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазою (MGMT) (дивись Weller et al, Nat Rev Neurol, 6, 2010, 39-51). Хворі, що мають таку систему репарації, страждають на «MGMT-позитивні GBMs». GBMs, таким чином, діляться на MGMT-негативні GBMs і MGMT-позитивні GBMs залежно від того, чи експресують вони ген MGMT. Сполуки формули I за даним винаходом або їх фармацевтично прийнятна сіль, як показано, активні не тільки проти MGMT-негативних GBMs, але і проти MGMT-позитивних GBMs.

Активність MGMT також важлива при інших астроцитарних пухлинах головного мозку, а саме дифузних астроцитоммах (клас II WHO) і анапластичних астроцитоммах (клас III WHO). Їх прогресія до GBMs опосередковується головним чином шляхом метилування за допомогою MGMT. Таким чином, можна зазначити, що, оскільки сполука формули I і її фармацевтично прийнятні солі активні проти MGMT-позитивних астроцитом, вони також будуть здатні запобігати прогресії цих дифузних і анапластичних астроцитом до GBMs.

Метастатична пухлина головного мозку являє собою пухлину головного мозку, яка починається як рак в будь-яких інших частинах тіла і поширюється на мозок. Рак молочної залози, легень, меланома, системна лімфома, саркома, рак товстої кишки, шлунково-кишкового тракту і нирок звичайно метастазує.

Первинна лімфома ЦНС в контексті даного винаходу являє собою лімфому, яка виникає в головному мозку з лімфоцитів, причому злоякісні клітини утворюються з вказаних лімфоцитів. Вона, отже, розглядається як пухлина головного мозку, оскільки її локалізація і терапевтичні проблеми схожі з іншими пухлинами головного мозку.

Термін «фармацевтично прийнятні солі» означає солі сполук за даним винаходом, які є фармацевтично прийнятними, як визначено вище, і які мають бажану фармацевтичну активність. Такі солі включають адитивні солі кислот, утворені з неорганічними кислотами або з органічними кислотами. Фармацевтично прийнятні солі також включають адитивні солі основ, які можуть бути утворені, коли присутні протони кислоти здатні взаємодіяти з неорганічними або органічними основами. Як правило, такі солі отримують, наприклад, взаємодією форм вільної кислоти або основи цих сполук зі стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або в органічному розчиннику або в суміші їх двох. Звичайно переважними є неводні середовища, такі як ефір, етилацетат, етанол, ізопропанол або ацетонітрил. Приклади адитивних солей кислоти включають адитивні солі неорганічних кислот, такі як, наприклад, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, сульфат, бісульфат, сульфамат, нітрат, фосфат, і адитивні солі органічних кислот, такий як, наприклад, ацетат, трифторацетат, малеат, фумарат, цитрат, оксалат, сукцинат, тартрат, саліцилат, тозилат, лактат, нафталінсульфонат, малат, манделат, метансульфонат і п-толуолсульфонат. Приклади адитивних солей основи включають неорганічні солі, такі як, наприклад, солі натрію, калію, кальцію і амоній, а також солі органічних

основ, такі як, наприклад, етилендіамін, етаноламін, N, N-діалкіленетаноламін, триетаноламін і солі основних амінокислот.

У даному винаході фармацевтично прийнятна сіль сполуки формули I може переважно являти собою гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, сульфат, бісульфат, сульфамат, нітрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, саліцилат, лактат, нафталінсульфонат або ацетат і більш переважно ацетат.

У даному винаході, коли сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль застосовується для лікування MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, її переважно вибирають з MGMT-позитивної мультиформної гліобластоми, дифузної астроцитом (клас II ВООЗ) і анапластичної астроцитом (клас III ВООЗ), і найбільш переважно з MGMT-позитивної мультиформної гліобластоми.

У даному винаході, коли сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль застосовується для лікування метастатичного раку головного мозку, його переважно вибирають з метастатичного раку молочної залози, метастатичної системної лімфоми, метастатичного раку легені, метастатичної меланоми, метастатичної саркоми і метастатичного раку шлунково-кишкового тракту, і найбільш переважно, з метастатичного раку молочної залози.

Терапевтично ефективна кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі і лікарського засобу, що містить їх, що вводиться хворому відповідно до першого, другого і третього аспектів даного винаходу, являє собою кількість, яка дає терапевтичний ефект відповідно до даного винаходу у індивідуума, який одержує лікування, при розумному співвідношенні користі/ризiku, придатному при будь-якому медикаментозному лікуванні. Терапевтичний ефект може бути об'єктивним (тобто вимірюваним деяким тестом або маркером) або суб'єктивним (тобто індивідуум свідчить про симптом або відчуває ефект). Ефективна кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі за даним винаходом, як вважається, являє собою кількість, в якій сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль входить в діапазон дозування від 0,1 до 70 мг/кг маси тіла хворого (наприклад, від 0,5 до 50 мг/кг маси тіла, наприклад, 1, 5, 10, 20, 30, 40 або 50 мг/кг маси тіла).

Конкретний терапевтично ефективний рівень дози для будь-якого конкретного хворого буде залежати від множини чинників, включаючи порушення, що підлягає лікуванню, і тяжкість захворювання; активність конкретної використовуваної сполуки; конкретну використовувану композицію; вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать і режим харчування хворого; час введення, шлях введення і швидкість виведення конкретної використовуваної сполуки; тривалість лікування; лікарські засоби, що використовуються в поєднанні або одночасно з конкретною використовуваною сполукою; і подібні чинники, добре відомі в сфері медицини.

Прийнятні приклади форми введення сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі і лікарського засобу, що містить їх, відповідно до першого, другого і третього аспектів даного винаходу, включають без обмежень пероральний, місцевий, парентеральний, сублінгвальний, ректальний, вагінальний, окулярний і інтраназальний шляхи. Парентеральне введення включає методи підшкірної ін'єкції, внутрішньовенної, внутрішньом'язової, інтратеральної ін'єкції або інфузії. Переважно, сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль і лікарський засіб, що містить їх, вводять парентерально і найбільш переважно внутрішньовенно.

Переважно сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль вводять хворому, який потребує цього, внутрішньовенно при рівні дози для хворого, який потребує цього, від 0,1 мг/кг до 70 мг/кг маси тіла хворого і найбільш переважно внутрішньовенно хворому, який потребує цього, при рівні дози від 0,5 мг/кг до 50 мг/кг маси тіла хворого.

Було виявлено, що в першому, другому і третьому аспектах даного винаходу сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, що містить їх, може бути переважно введена в організм хворого, який потребує цього, на 1, 8 і 15 день циклу лікування, на 1 і 8 день циклу лікування або тільки на 1 день циклу лікування.

У іншому переважному варіанті здійснення першого, другого і третього аспектів даного винаходу несподівано було виявлено, що сполука формули I і її фармацевтично прийнятні солі є значно більш ефективними при введенні в поєднанні з променевою терапією, і дійсно, як представляється, діють синергічно з променевою терапією в дослідженнях як *in vitro*, так і *in vivo*. Як наслідок, в першому, другому і третьому аспектах даного винаходу сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, що містить їх, може бути використана при лікуванні хворого, який потребує цього, де хворий, який потребує цього, також отримує променевою терапією або до, або після лікування раку головного мозку за допомогою

сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі або ліків, що містить їх. Переважно, щоб хворий отримував лікування променевою терапією перед лікуванням за допомогою сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі або лікарського засобу, що містить їх. Променева терапія може бути дана в дозі від 1 до 5 Гр протягом 5 послідовних днів, і переважно 2 Гр протягом 5 послідовних днів.

У ще одному переважному варіанті здійснення першого, другого і третього аспектів даного винаходу лікування додатково включає введення хворому, який потребує цього, інгібітору фактора росту ендотелію судин (VEGF) і сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, і інгібітор фактора росту ендотелію судин (VEGF) можна вводити одночасно, послідовно або окремо, і переважно одночасно. Переважно, інгібітор фактора росту ендотелію судин (VEGF) являє собою бевацизумаб.

У ще одному переважному варіанті здійснення першого, другого і третього варіантів здійснення даного винаходу лікування додатково включає введення хворому, який потребує цього, інгібітору полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) і сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, і інгібітор полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) можна вводити одночасно, послідовно або окремо, і переважно одночасно. Переважно інгібітор полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) вибраний з рукапарибу, олапарибу і веліпарибу.

У ще одному переважному варіанті здійснення першого, другого і третього варіантів здійснення даного винаходу лікування додатково включає введення хворому, який потребує цього, інгібітору PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки), і сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, і інгібітор PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки) можна вводити одночасно, послідовно або окремо, і переважно одночасно. Переважно інгібітор PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки) являє собою іпілімуаб.

При використанні для перорального введення сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу можуть бути в твердій або рідкій формі, де напівтверда, напіврідка суспензії і гелеві форми включені в межі форм, що розглядаються в даному документі як тверді або рідкі.

Сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу можуть бути отримані для введення з використанням методу, добре відомого в галузі фармацевтики. Приклади прийнятних фармацевтичних композицій і носіїв описані Е. W. Martin в «Remington's Pharmaceutical Sciences».

Як тверда композиція для перорального введення сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу можуть бути складені у вигляді порошку, гранул, пресованих таблеток, драже, капсул, жувальної гумки, пластинки або тому подібних форм. Така тверда композиція звичайно містить один або більше інертних розріджувачів, або у вигляді єдиної таблетки, що містить всі активні агенти, або у вигляді ряду окремих твердих композицій, причому кожна з яких включає один активний агент з поєднання за даним винаходом (у разі набору). Крім того, може бути присутнім одне або більш з наступного: зв'язувальні агенти, такі як карбоксиметилцелюлоза, етилцелюлоза, мікрокристалічна целюлоза або желатин; наповнювачі, такі як крохмаль, лактоза або декстрини, розпушувачі, такі як альгінова кислота, альгінат натрію, кукурудзяний крохмаль і тому подібне; мастильні агенти, такі як стеарат магнію; гліданти, такі як колоїдний діоксид кремнію; підсолоджувачі, такі як сахароза або сахарин; ароматизувальний агент, такий як м'ята перцева, метилсаліцилат або апельсиновий ароматизатор і забарвлюючий агент.

Коли сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу знаходяться в формі капсули (наприклад, желатинової капсули), вона може містити, в доповнення до речовин вказаного вище типу, рідкий носій, такий як поліетиленгліколь, циклодекстрин або жирне масло.

Сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу можуть бути у вигляді рідини, наприклад, у вигляді еліксиру, сиропу, розчину, емульсії або суспензії. Рідина може бути корисна для перорального введення або для доставки шляхом ін'єкції. При використанні для перорального введення сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу може включати одне або більш з підсолоджувача, консервантів, барвника/забарвлюючого агента і підсилювача смакоароматичних властивостей. У сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу для введення шляхом ін'єкції може бути також включене

одне або більше з поверхнево-активної речовини, консерванту, змочувальної агента, диспергувального агента, суспендувального агента, буфера, стабілізатора і ізотонічного агента.

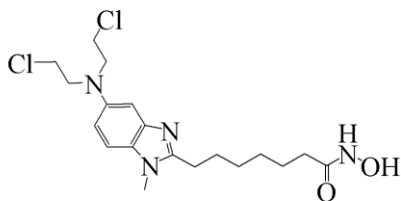
Переважаючим шляхом введення є парентеральне введення, включаючи, але, не обмежуючись цим, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне, підшкірне, інтраназальне, епідуральне, інтраназальне, внутрішньоцеребральне, внутрішньошлуночкове, інtrateкальне, інтравагінальне або трансдермальне введення. Переважний шлях введення залишається на розсуд практикуючого лікаря, і повинен частково залежати від локалізації патологічного порушення (наприклад, локалізації раку). У більш переважному варіанті здійснення сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу вводять внутрішньовенно.

Рідка сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу, чи є вона розчином, суспензією або іншою аналогічною формою, також може включати одне або більше з наступного: стерильні розріджувачі, такі як вода для ін'єкцій, сольовий розчин, переважно фізіологічний сольовий розчин, розчин Рінгера, ізотонічний розчин хлориду натрію, нелеткі масла, такі як синтетичні моно- або дигліцериди, поліетиленгліколі, гліцерин або інші розчинники; антибактеріальні агенти, такі як бензиловий спирт або метилпарабен; і агенти для доведення тоничності, такі як хлорид натрію або декстроза. Парентеральні поєднання або композиції можуть бути поміщені в ампулу, одноразовий шприц або флакон для множинних доз, виготовлений зі скла, пластику або іншого матеріалу. Фізіологічний сольовий розчин є переважним ад'ювантом.

Сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль або лікарський засіб, який їх містить, згідно з першим, другим і третім аспектами даного винаходу можна вводити будь-яким зручним способом, наприклад, шляхом інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом абсорбції через епітеліальну або шкірно-слизову вистілки і переважно шляхом болюсного введення.

ПРИКЛАДИ

У наступних прикладах, сполука, яка має наступну формулу I, позначається як



I

EDO-S101.

EDO-S101 отримували, як описано в прикладі 6 патенту WO-A-2010/085377. EDO-S101 розчиняли в ДМСО (100× маточного розчину) і зберігали при 4 °C до суспендування в середовищі в день використання.

Приклад 1. Фармакокінетичний аналіз надходження EDO-S101 в ЦНС у щурів Sprague-Dawley

Фармакокінетику в ЦНС визначали у щурів після ін'єкції EDO-S101 в дозі 40 мг/кг в хвостову вену. Зразки мікродіалізатів збирали з крові і шлуночка головного мозку шляхом мікродіалізу проб через 18 часових інтервалів. Концентрації лікарського засобу в цих зразках визначали за допомогою капілярного електрофорезу з УФ-детектування (CE-UV) з подальшими розрахунками для різних фармакокінетичних параметрів.

Шість щурів анестезували газоподібним ізофлураном (1% ізофлуран в суміші газоподібних 20% кисню і 80% азоту) і іммобілізували в стереотаксичній рамі (KOPF Instruments, Tujunga, CA). Анестезію підтримували протягом всієї процедури. Кожну напрямну канюлю (CMA Microdialysis Inc., Acton, MA) стереотаксично імплантували в бічний шлуночок (AP-0,9, L 1,6, V 3,4, по відношенню до тімені і черепа) і потім кріпили до черепа за допомогою гвинтів і зубного цементу. Після операції кожного щура розміщували індивідуально з наданням їжі і води без обмежень протягом 3 днів для відновлення після хірургічної катетеризації. Експерименти по

мікродіалізу проводили на щурі, що вільно пересувається, що знаходиться в свідомості. У день експерименту мандрен напрямної канюлі замінювали зондом для мікродіалізу (CMA/11 з 4 мм мембраною, CMA Microdialysis Inc., Acton, MA), і зонд для мікродіалізу в посудинах (CMA/20 з 4 мм мембраною, CMA Microdialysis Inc, Acton, MA)) імплантували в яремну вену. Зонди мали впускні трубочки, пов'язані з шприцями для доставки штучної спинномозкової рідини (146 mM NaCl, 1,2 mM CaCl₂, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,9 mM Na₂HPO₄, 0,1 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) в шлуночок і забуференого фосфатом фізіологічного розчину Дульбекко (D-PBS) в кров зі швидкістю потоку 0,5 мкл/хв. Випускні трубочки з'єднували з колектором для мікрофракціонування для збору мікродіалізатів при 4 °C. Щурам давали відновитися протягом щонайменше 24 годин перед введенням доз. Вісімнадцять зразків збирали протягом 3 годин після введення EDO-S101 (внутрішньовенно). Всі зразки піддавали капілярному електрофорезу з УФ-детектування (CE-UV) для визначення концентрації EDO-S101 в цереброспінальній рідині (CSF) і крові. Щурів умертвляли за допомогою інгаляції CO₂ після експерименту. Положення зонда підтверджували шляхом візуального огляду в кінці кожного експерименту.

EDO-S101 в мікродіалізаті вимірювали за допомогою CE-UV (Agilent 3D CE). Коротко, капіляри прекодиціювали 1 М гідроксидом натрію протягом 2 хв., водою протягом 2 хв. і рухомим буфером [100 ммоль/л розчин ацетату амонію (з доведенням pH до 3,1 за допомогою оцтової кислоти) - ацетонітрил (50:50, об./об.)] протягом 3 хв. Зразки вводили під тиском 4826,5 Па протягом 5 сек., і ін'єкційний об'єм становив приблизно 5 нл. Після ін'єкції EDO-S101 відділяли в об'єднаному кварцовому капілярі з внутр. діам. 50 мкм і довжиною 50/65 см (ефективна довжина/загальний довжина) при 15 кВ і 25 °C. Оптичну густину EDO-S101 визначали в УФ при 300 нм. Емісію вловлювали на фотопомножувач (PMT).

Для здійснення статистичного аналізу даних використали двосторонній критерій ANOVA з повторними вимірюваннями з подальшим тестом Тьюкі. P<0,05 розглядали як значущий. Проникнення в ЦНС визначали як відношення області CSF і площі під кривою (AUC).

При аналізі результатів виявлено, що EDO-S101 добре перетинає гематоенцефалічний бар'єр з проникненням в ЦНС 16,5% (дивись фігуру 1). Він може досягнути високої концентрації в ЦНС з C_{макс} 11,2 мкМ. Таким чином, EDO-S101 ідеально підходить для терапевтичного застосування при пухлинах головного мозку. Було також показано, що він має дуже короткий період напівжиття приблизно 6 хвилин в крові і приблизно 9 хвилин в головному мозку. Оскільки концентрації лікарського засобу визначали на основі поглинальної здатності EDO-S101 при довжині хвилі УФ 300 нм, всі вимірювання торкаються неметаболізованого EDO-S101. Результати підсумовані в таблиці 1 таким чином.

Таблица 1

Параметри РК	Кров	Мозок
C _{max} (мкМ)	184,0±61,8	11,2±6,5
T _{макс} (хв.)	2,33±0,82	5,67±1,97
T _{1/2} (хв.)	5,6±1,07	8,8±1,43
AUC (0-12) (мкМ.год.)	824,3±110,8	136,2±74,7
Відношення AUC (Мозок:кров)	16,5%±0,09	

Приклад 2. Тести на активність in vitro для EDO-S101 і відомих сполук проти різних MGMT-позитивних і негативних клітинних ліній

Розроблені експерименти in vitro, в яких використані серії клітинних ліній GBM, репрезентативних відносно MGMT-негативних і MGMT-позитивних пухлинних клітин.

Сполука: 1-100 мкМ EDO-S101, 1-50 мкМ темозоломід (TMZ), 1-50 мкМ темозоломід+500 нМ вориностат, 1-40 мкМ бендамустин, 1-40 мкМ бендамустин і 500 нМ вориностат.

Клітинні лінії: A172, LN229, SNB19, SW1783, U251, U373 і U87: MGMT-негативні клітинні лінії; LN18, Mz54, T98G, U138, U118: MGMT-позитивні клітинні лінії.

Використовували дванадцять клітинних ліній гліобластоми, що представляють класи III і IV гліом з різною експресією MGMT, чутливістю до лікарської і променевої терапії, і п'ять стовбурових клітин гліобластом від хворих (дивись вище). Стовбурові клітини чотирьох гліобластом, отриманих від хворих, люб'язно надані J. Gregory Cairncross і Samuel Weiss з Hotchkiss Brain Institute, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, і клітини, трансфіковані люциферазою, PTC#8, від Prof Angelo Vescovi, University la Bicocca, Milan, культивували в безсироватковому культуральному середовищі певного складу (SFM) і в культурі сфер, які не прилипають. Клітини ресуспендували в безсироватковому середовищі DMEM/F12 з 20 нг/мл епідермального фактора росту (Sigma-Aldrich), 20 нг/мл основного

фактора росту фібробластів (Sigma-Aldrich), добавкою B-27 1× (Gibco, Life Technologie)s і антибіотиками. Лікування додаванням EDO-S101 проводили відразу після посіву 3×10^3 клітин в 96-ямові планшети із середовищем для стовбурових клітин. Сфери підраховували через 5 днів після обробки під інвертованим мікроскопом при збільшенні $\times 4$. Сфери підраховували, якщо вони мали щонайменше 15 клітин.

Клітини висівали при щільності 2×10^4 клітин/мл в 24-ямові планшети. Клітини залишали для прикріплення і росту в 5% FCS DMEM протягом 24 годин. Після закінчення цього часу клітини підтримували у відповідних умовах культивування. Морфологічний контроль проводили кожний день за допомогою інвертованого фазово-контрастного фотомікроскопа (Nikon Diaphot, Токуо, Япон) перед трипсинізацією клітин і підрахунком. Трипсинізовані і ресуспендовані в 1,0 мл фізіологічного сольового розчину клітини підраховували з використанням NucleoCounter™ NC-100 (систем автоматичного підрахунку клітин, Chemotec, Cydevang, DK) для оцінки життєздатності клітин. Всі експерименти проводили в трьох паралелях. Величини IC_{50} обчислювали по методу GraFit (Erithacus Software Limited, Staines, UK). Життєздатність клітин оцінювали за допомогою аналізу з використанням броміду 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію (MTT, Sigma-Aldrich).

Були також визначені величини IC_{50} і IC_{20} для всіх дванадцяти клітинних ліній під дією бендамустину і вориностату, як описано вище. Потім були виконані сукупні аналізи з фіксованою дозою вориностату (величина IC_{20}) і змінюваною дозою бендамустину. Нові величини IC_{50} розраховували для бендамустину в поєднанні з вориностатом.

Як можна бачити на фігурі 2, клітинні лінії GBM U251, U373, SW1783, A172 і U87 високочутливі до TMZ, в той час як LN229, SNB19 і U138 помірно чутливі. MGMT-позитивні клітинні лінії GBM LN18, Mz54, T98G і U118, однак, були стійкі до TMZ.

У окремому експерименті TMZ використовували в поєднанні з 500 нМ вориностату. Відомо, що вориностат діє синергічно з TMZ в клітинних лініях GBM. Як можна бачити на фігурі 3, в той час як MGMT-позитивні клітинні лінії GBM LN18 і U118 чутливі до цього поєднання, T98G і Mz54 все ще залишаються дуже стійкими. IC_{50} T98G була знижена, але не знаходилася в діапазоні досяжних доз в організмі людини.

На фігурі 4 продемонстровано, що жодна з клітинних ліній GBM не була високочутливою до бендамустину, при цьому клітинні лінії GBM LN18, LN229, SNB19, U138, U251, U373, SW1783 і U87 були помірно чутливі до бендамустину, тоді як A172, Mz54, T98G і U118 були стійкі до бендамустину. Як можна бачити на фігурі 5, коли бендамустин поєднувався з 500 нМ вориностату, були досягнуті результати, дуже схожі на результати з TMZ і вориностатом, тобто всі клітинні лінії були високочутливими за винятком Mz54 і T98G і при цьому IC_{50} T98G була знижена, але не знаходилася в діапазоні досяжних доз в організмі людини.

У порівнянні з іншими окремими сполуками і їх поєднаннями, криві IC_{50} для дванадцяти протестованих клітинних ліній на фігурі 6 показують, що всі дванадцять клітинних ліній, включаючи всі MGMT-позитивні клітинні лінії, були високочутливими до EDO-S101. Це свідчить про те, що EDO-S101 є дуже перспективним терапевтичним агентом проти як MGMT-негативних, так і MGMT-позитивних GBMs.

Зведення величин IC_{50} для різних клітинних ліній представлено в наступній таблиці 2.

Таблиця 2

Клітинна лінія	Походження	Характеристика	Бенда-мустин	EDO-S101	Темозо-ломід
U251MG	Sigma-Aldrich (09063001)	MGMT-негативн.	30,0	6,60	20,0
U87MG	ATCC (HTB-14)	MGMT-негативн.	50,0	1,36	20,0
T98G	ATCC CRL-1690	MGMT-позитивн.	52,0	7,70	>100
U118MG	HTB-15	MGMT-позитивн.	35,0	6,61	>100
U373MG (Uppsala)	Sigma-Aldrich (08061901)	MGMT-негативн.	35,0	2,26	80,0
Mz-54	Goethe-University Frankfurt	MGMT-позитивн.	60,0	12,73	>100
A172	CRL-1620	MGMT-негативн.	55,0	6,45	>100
U138MG	ATCC (HTB-16)	MGMT-позитивн.	30,0	4,27	>100
LN228	ATCC (CRL-2611)	MGMT-негативн.	35,0	1,55	>100
SW1783	ATCC (HTB-13)	MGMT-негативн.	38,0	8,24	80,0
LN18	ATCC (CRL-2610)	MGMT-позитивн.	25,0	1,87	>100
SNB19	NCI	MGMT-негативн.	32,0	2,17	>100

Приклад 3. Оцінка EDO-S101 in vivo в мишачих моделях мультиформної гліобластоми

Терапевтичну активність EDO-S101 проти GBM визначали в мишачих моделях пухлин головного мозку, основуючись на рості пухлини, визначеному по візуалізації біолоюмінесценції, і на аналізі виживаності, визначеної за допомогою методу Каплана-Мейєра.

Мишачі моделі пухлин головного мозку створювали за допомогою внутрішньомозкової ін'єкції 3×10^5 клітин GBM12, трансфікованих люциферазою, безтимусним мишам під анестезією з використанням стереотаксичної платформи. GBM12 являє собою MGMT-негативну пухлинну клітинну лінію. Безтимусним мишам у віці вісім тижнів давали акліматизуватися/бути на карантині мінімум 7 днів перед хірургічним втручанням. Операцію виконували в ламінарному боксі в стерильних умовах. Тайленол 300 мг/кг перорально давали для аналгезії за 24 години до початку операції, продовжуючи давати протягом 48 годин після операції. Анестезія досягалася шляхом інгаляції 1-2% ізофлурану. Після хорошої наркотизації мишу вміщували в стереотаксичний прилад Kopf. Невеликою кількістю мазі з антибіотиками BNP (суміш бацитрацину, неоміцину і поліміксину) мастили її очі, щоб запобігти інфекції і пошкодженню рогівки під час операції. М'яку тканину вміщували над тілом і хвостом миші для запобігання надмірній втраті тепла під час операції. Область шкіри голови очищали 2% розчином бетадину і висушували за допомогою ватяної палички. Робили сагітальний надріз в шкірі голови по середній лінії.

Невеликий трепанаційний отвір просвердлювали в лівій частині черепа за допомогою хірургічного свердла (Kopf) або свердла Dremel відповідно до координат (AP: 0,5 мм, LM: 2,5 мм), визначеними по посиланню на атлас мозку миші Franklin і Paxinos. Тверду мозкову оболонку експонували хірургічно, і гамільтонівський шприц на 10 мкл зі скошеною голкою калібру 26S занурювали в ліву півкулю мозку на глибину до 3 мм і повільно (0,5 мкл/хв.) інфузували 5 мкл 3×10^5 пухлинних клітин GBM12, трансфікованих люциферазою. Голку залишали на місці протягом 5 хвилин, щоб запобігти рефлюксу, а потім повільно виймали. Шкіру змикали дужками для ран. Після операції миші опам'яталися в теплому навколишньому середовищі, і їх повертали в їх клітки при відновленні рухової активності. Клітини вміщували на верхню частину електричної грілки для зведення до мінімуму втрати тепла тіла під час відновлення. За мишами спостерігали після операції щонайменше два рази на день протягом 5 днів або до завершення відновлення. EDO-S101 (60 мг/кг маси тіла) або бендамустин (50 мг/кг маси тіла) вводили через хвостову вену, починаючи з +4 дня після внутрішньомозкової імплантації пухлинних клітин, і потім в наступні +11 день і +18 день. Параліч кінцівок розглядався як кінцева точка при аналізі виживаності.

Після внутрішньомозкової ін'єкції клітин GBM всіх мишей піддавали біолоюмінесцентній візуалізації (BLI) два рази на тиждень, починаючи з 4 дня після внутрішньомозкової ін'єкції, для моніторингу в режимі реального часу зростання пухлини in vivo. BLI проводили з використанням оптичної системи формування зображень Xenogen Lumina (Caliper Life Sciences, Norwalk, MA). Мишей анестезували ізофлураном перед внутрішньоочеревинними ін'єкціями люциферину в дозі 150 мг/кг, що забезпечує насичуючу концентрацію субстрату для ферменту люциферази. Пікові люмінесцентні сигнали реєструвалися через 10 хвилин після ін'єкції люциферину. Цікавлі області, що охоплюють внутрішньочерепну область сигналу, визначали з використанням програмного забезпечення Living Image (Xenogen, Alameda, CA), і реєстрували загальну кількість фотонів/сек/стерадіан/см².

Дисперсійний аналіз ANOVA використовували для визначення статистичної значущості відмінностей між експериментальними групами в кожній часовій точці. Криві виживаності Каплана-Мейєра отримували з використанням програмного забезпечення Prism4 (GraphPad Software, LaJolla CA), і статистичні відмінності між кривими визначали за допомогою лог-рангового тесту. Відмінності з $P < 0,05$ розглядали як значущі.

У моделі ксенотрансплантата GBM (GBM12), отриманого від хворого, EDO-S101 вводили в.в. в дозі 60 мг/кг щотижня на +4, +11, +18 дні після внутрішньомозкової імплантації пухлинних клітин (доза MTD). Бендамустин давали в.в. в дозі 50 мг/кг щотижня на +4, +11, +18 дні (доза MTD). EDO-S101, як встановлено, мав істотну терапевтичну активність з придушенням росту пухлини і продовженням виживаності з медіаною виживаності 66 днів в порівнянні з 58 днями з бендамустином і 52 днями у контролі без лікування (дивись фігури 7a і 7b). EDO-S101 має відмінну терапевтичну активність проти цієї MGMT-негативної гліобластоми.

Аналогічним чином слідували представленій вище процедурі з використанням клітинних ліній U87G і U251G. Знову EDO-S101 (60 мг/кг) вводили внутрішньовенно через хвостову вену, але в цих експериментах його вводили на 1, 8 і 15 день. Замість бендамустину для порівняння вводили TMZ в дозі 16 мг/кг протягом 5 послідовних днів, перорально. Мишей умертвляли через 28 днів.

Графік залежності ймовірного часу до прогресії (ТТР) (%) від часу на фігурі 8 для мишей, які несуть імплантовані пухлини U251, демонструє, що ТТР у мишей, яких лікували EDO-S101, був значно довшим, ніж спостережуваний як у контрольних мишей, так і у мишей, що отримували TMZ. Аналогічне значне збільшення ТТР спостерігалось у мишей, які несуть імплантовані пухлини U87, причому у випадку EDO-S101 вони мали значно більш довгий ТТР, ніж і у контролю, і з введенням TMZ (фігура 9).

Приклад 4. Оцінка EDO-S101 in vivo (одного або в поєднанні з променевою терапією) в мишачих моделях мультиформної гліобластоми в порівнянні з променевою терапією і темозоломідом (одного або в поєднанні)

У першому експерименті клітинні лінії U251, U87 і T98G обробляли тільки опроміненням або опроміненням і EDO-S101.

Для клоногенного виживання експонентно зростаючі клітини (70% конфлюентності) культивували в звичайних середовищах і обробляли EDO-S101 у відповідних концентраціях або носієм (кінцева концентрація ДМСО 0,1%) протягом 24 годин. Опромінення пухлинних клітин проводили з використанням 6 мВ лінійного прискорювача Elekta Synergy з використанням клінічно каліброваного поля опромінення 30×30 см. Пластини плексигласу товщиною два см розташовували вище і нижче матраців з клітинною культурою, повністю заповнених середовищем для компенсації ефекту нарощування. Неопромінені контролю обробляли ідентично опроміненим клітинами за винятком радіаційного впливу. Після обробки клітини розводили у відповідній концентрації (1000 клітин) і знову висівали в нову 100 мм чашку Петрі (в трьох паралелях) і інкубували протягом 14 днів. На 14 день середовище видаляли, і колонії фіксували сумішшю метанол:оцтова кислота (10:1, об./об.) і забарвлювали кристалічним фіолетовим. Колонії, що містять більше 50 клітин, підраховували. Ефективність посіву (PE) розраховували як число спостережуваних колоній/число посіяних клітин. Фракцію тих, що вижили розраховували як кількість утворених колоній в оброблених чашках в порівнянні з кількістю утворених колоній в контролі. Криві виживаності аналізували за допомогою статистичного програмного забезпечення SPSS (Chicago, IL) шляхом апроксимації даних за допомогою зваженої, стратифікованої, лінійної регресії відповідно до лінійно-квадратичної формули: $S(D)/S(O) = \exp(-(aD + bD^2))$.

Для MGMT-негативної клітинної лінії гліобластоми U251 виміряна IC_{50} становила 6,60 мкМ для EDO-S101 (в порівнянні з 30 мкМ для бендамустину і 20 мкМ для темозоломіду).

Для MGMT-негативної клітинної лінії гліобластоми U87G виміряна IC_{50} становила 1,36 мкМ для EDO-S101 (в порівнянні з 50 мкМ для бендамустину і 20 мкМ для темозоломіду).

Для MGMT-позитивної клітинної лінії гліобластоми T98G виміряна IC_{50} становила 7,70 мкМ для EDO-S101 (в порівнянні з 52 мкМ для бендамустину і >100 мкМ для темозоломіду).

Як можна бачити з фігури 10, % рівня виживаності клітин гліобластоми був значно знижений, коли променевою терапією використовували в поєднанні з дозою EDO-S101 (2,5 мкМ або 5 мкМ), в порівнянні тільки з променевою терапією, у всіх 3-х клітинних лініях GBM.

Далі, адаптуючи метод, описаний в прикладі 3, отримували підшкірні моделі ксенотрансплантатів GBMs у мишей з використанням клітинних ліній GBM U251 і U87.

Мишей U251, отриманих, як описано вище, піддавали або променевої терапії (2 Гр протягом 5 послідовних днів), або лікуванню EDO-S101 (60 мг/кг внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або тільки контрольним процедурам. Перед будь-яким опроміненням мишей анестезували сумішшю кетаміну (25 мг/мл)/ксилазіну (5 мг/мл). Анестезовані миші-пухлиноносії отримували фокальне опромінення в дозі 2 Гр протягом 5 послідовних днів. Опромінення здійснювалося за допомогою лінійного прискорювача рентгенівських променів з потужністю дози 200 сГр/хв. при кімнатній температурі. Всі миші були захищені спеціально розробленим свинцевим апаратом, що дозволяє опромінювати праву задню кінцівку. Мишей утримували в цих умовах до закінчення опромінення.

Досліджували прогресію GBM відповідно до методу, описаного в прикладі 3. Графік залежності ймовірного часу до прогресії (%) від часу показаний на фігурі 11. Виходячи з нього, очевидно, що час до прогресії у мишей, яких лікували EDO-S101, значно довший, ніж спостережуваний при лікуванні пухлин променевою терапією.

У додатковому експерименті мишей U251, отриманих таким же способом, піддавали або наявним в цей час золотим стандартом лікування - променевою терапією і темозоломідом (2 Гр протягом 5 послідовних днів і 16 мг/кг протягом 5 послідовних днів, перорально), або лікуванням EDO-S101 (60 мг/кг, внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або лікуванням EDO-S101 і променевою терапією (2 Гр протягом 5 послідовних днів і 60 мг/кг, внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або контрольним впливом. Графік залежності ймовірного часу до прогресії (%) від часу показаний на фігурі 12. Виходячи з цього, очевидно, що час до прогресії у мишей,

яких лікували EDO-S101 і променевою терапією, значно довший, ніж спостережуваний для пухлин, оброблених тільки EDO-S101. Крім того, час до прогресії для поєднання променевої терапії і EDO-S101 був значно довшим, ніж спостережуваний для пухлин, оброблених променевою терапією і темозоломідом, поточним золотим стандартом лікування.

5 Слідували тій же послідовності експериментів, але на цей раз на мишачій моделі підшкірного ксенотрансплантата GBM, отриманого з використанням клітинної лінії GBM U87. У першому експерименті мишей U87, отриманих, як описано вище, піддавали або променевій терапії (2 Гр протягом 5 послідовних днів), або лікуванню EDO-S101 (60 мг/кг внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або тільки контрольному впливу. Проводили дослідження
10 прогресії GBM. Графік залежності ймовірного часу до прогресії (%) від часу показаний на фігурі 13. Виходячи з цього, очевидно, що час до прогресії у мишей, яких лікували EDO-S101 (визначено на фігурі 13 як NL101), значно довший, ніж спостережуваний для пухлин, на які впливали променевою терапією.

У додатковому експерименті, схожому з експериментом на мишах U251, мишей U87, отриманих таким же способом, піддавали або лікуванню наявним в цей час золотим стандартом - променевою терапією і темозоломідом (2 Гр протягом 5 послідовних днів і 16 мг/кг протягом 5 послідовних днів, перорально), або лікуванню EDO-S101 (60 мг/кг, внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або лікуванню EDO-S101 і променевою терапією (2 Гр протягом 5 послідовних днів і 60 мг/кг, внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування), або контрольному
20 впливу. Графік залежності ймовірного часу до прогресії (%) від часу показаний на фігурі 14. Виходячи з цього, очевидно, що час до прогресії у мишей, яких лікували EDO-S101 і променевою терапією, значно довший, ніж спостережуваний для пухлин, оброблених тільки EDO-S101. Крім того, час до прогресії для поєднання променевої терапії і EDO-S101 був значно довшим, ніж спостережуваний для пухлин, оброблених променевою терапією і темозоломідом, поточним золотим стандартом лікування. Потрібно також зазначити, що час до прогресії,
25 виявлений у мишей U87, що отримували тільки EDO-S101, був дійсно вищим, ніж що досягається спільним лікуванням променевою терапією і темозоломідом.

Час до прогресії пухлин ріс від приблизно 17-18 днів для контролю у мишачої моделі ксенотрансплантата U251G, до 42 днів для поєднання променевої терапії і темозоломідом, до
30 більше 50 днів для одного EDO-S101 (значущість відмінностей $P=0,924$), до значно більше 50 днів для поєднання EDO-S101 і променевої терапії (значущість відмінностей $P=0,0359$).

Встановлено, що час до прогресії пухлин ріс від приблизно 15 днів для контролю в мишачій моделі ксенотрансплантата U87G, до 35 днів для поєднання променевої терапії і темозоломідом, до 40 днів для одного EDO-S101 (значущість відмінностей $P=2372$), до істотно більше 50 днів
35 для поєднання EDO-S101 і променевої терапії (значущість відмінностей $P=0,0001$).

Приклад 5. Гістологічна оцінка пухлин: ортотопічна модель клітин U251, трансфікованих люциферазою

Мишей, ізотопно трансфікованих U251-люциферазою відповідно до методу, описаного в прикладі 3, лікували променевою терапією (2 Гр протягом 5 послідовних днів), темозоломідом
40 (16 мг/кг протягом 5 послідовних днів, перорально), променевою терапією і темозоломідом (2 Гр протягом 5 послідовних днів і 16 мг/кг протягом 5 послідовних днів, перорально), EDO-S101 (60 мг/кг, внутрішньовенно на 1, 8 і 15 дні циклу лікування) або контрольним носієм.

Зростання внутрішньочерепної пухлини простежували за допомогою системи візуалізації Hamamatsu (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Мишей анестезували від 2% до 4% ізофлуораном (Baxter, Deerfield, IL, USA) з подальшими внутрішньоочеревинними ін'єкціями 150
45 мг/кг d-люциферину (In vivo Imaging Solutions). У один і той же час вимірювали п'ять тварин, і люмінесцентна камера була встановлена на 1 хвилинній експозиції, середньому бінінгу, 1 f/стоп, блокованому фільтрі збудження і відкритому фільтрі випромінювання. Фотографічна камера була встановлена на 2 сек експозиції, середньому бінінгу і 8 f/стоп. Поле огляду було
50 встановлене на 22 см, щоб захопити п'ять мишей відразу. Серійні зображення робили щотижня, використовуючи однакові настройки. Інтенсивність біolumінесценції оцінювали кількісно за допомогою програмного забезпечення Living Image (Caliper Life Sciences).

Перед будь-яким опроміненням мишей анестезували сумішшю кетаміну (25 мг/мл)/ксилазіну (5 мг/мл). Анестезовані миші-пухлиноносії отримували фокальне опромінення
55 в дозі 2 Гр протягом 5 послідовних днів. Опромінення здійснювалося за допомогою лінійного прискорювача рентгенівських променів з потужністю дози 200 сГр/хв. при кімнатній температурі. Всі миші були захищені спеціально розробленим свинцевим апаратом, що дозволяє опромінювати праву задню кінцівку. Мишей утримували в цих умовах до закінчення опромінення.

Всі зображення були отримані в поперечній площині, використовуючи наступні послідовності: поперечна T2-зважена турбо спін-луна (TSE) послідовність (час повторення [TR] мсек/луна час [TI] мсек) 6766/120, кількість отриманих сигналів 4, матриця 192(192), застосована з товщиною перерізу 0,9 мм, томографічний крок 0,0 мм, і дзеркальний кут 160°.

5 Поле зору становило 36×60 мм², яке повністю включало пухлину з результируючим розміром воксела 0,3×0,3×1,0 мм³.

Безперервні змінні були узагальнені у вигляді середнього значення і стандартного відхилення (SD) або у вигляді медіани і 95% довір. інт. для медіани. Для безперервних змінних, що не мають нормального розподілу, статистичні порівняння між контрольними і дослідними групами проводили шляхом використання критеріїв Крускала-Уолліса. Для безперервних змінних, що мають нормальний розподіл, статистичні порівняння між контрольними і дослідними групами проводили шляхом використання критерію ANOVA або t-тесту Стюдента для непарних даних (для двох порівнянь).

Через 50 днів після початку різних схем лікування мишей умертвляли, і кінцеві внутрішньочерепні ураження візуалізували у мишей, що отримували лікування контрольним впливом, EDO-S101, темозоломідом і променевою терапією і темозоломідом. Результати показані на фігурах 15 і 16. Схожі результати були досягнуті при дослідженні як EDO-S101, так і темозоломідом, у випадку обох 5 з 13 мишей були з пухлинами певної стадії (38,5%) в порівнянні із 8 з 11 (72,7%) в контролі. Однак тільки 1 з 13 мишей, що отримували EDO-S101, демонструвала велике ураження, в той час як 2 з 13 мишей, що отримували темозоломід, демонстрували великі ураження. При дослідженні променевої терапії і темозоломідом тільки 2 з 11 мишей (18,2%) демонстрували ураження в кінці дослідження, хоча у обох з них ураження були великими. З цього можна зробити висновок, що EDO-S101 є високоефективним відносно запобігання поширенню GBMs.

Ефективність EDO-S101 в запобіганні поширенню GBMs додатково підкреслюється на фігурі 17, що представляє графік залежності імовірності виживання (%) від часу (дні). Імовірність виживання мишей, яких лікували EDO-S101, була значно більшою, ніж мишей, що отримували або променевою терапією, або темозоломідом. Тільки миші, що отримували поєднання променевої терапії і темозоломідом, показали більш високу загальну імовірність виживання, ніж один EDO-S101.

Приклад 6. Оцінка EDO-S101 in vivo в мишачих моделях первинної лімфоми ЦНС

Повторювали методику прикладу 3 за винятком того, що мишачі моделі були створені з 1×10^5 клітинами лімфоми OCI-LY10B, трансфікованими люциферазою, для створення моделі первинної лімфоми ЦНС. EDO-S101 (60 мг/кг маси тіла), бендамустин (50 мг/кг маси тіла) і контроль вводили внутрішньовенно через хвостову вену окремим групам випробуваних мишей на +4, +11 і +18 дні після внутрішньомозкової імплантації клітин лімфоми OCI-LY10B. Як EDO-S101, так і бендамустин значно придушували ріст пухлини і пролонгували виживаність з медіаною виживаності 62 дні і 54 дні, відповідно в порівнянні з 48 днями в контролях без лікування (дивись фігури 18a і 18b). EDO-S101, отже, як представляється, є перспективним для лікування первинної лімфоми ЦНС.

Приклад 7. Оцінка EDO-S101 in vivo в мишачих моделях потрійного метастатичного раку молочної залози з метастазами в головний мозок

Повторювали метод прикладу 3 за винятком того, що мишачі моделі були створені з 1×10^5 клітками MB-468 раку молочної залози, трансфікованими люциферазою, для створення моделі первинної лімфоми ЦНС. EDO-S101 (60 мг/кг маси тіла), бендамустин (50 мг/кг маси тіла) і контроль вводили внутрішньовенно через хвостову вену окремим групам випробуваних мишей в єдиній дозі на +4 день після внутрішньомозкової імплантації клітин MB-468 раку молочної залози. EDO-S101 показав значну терапевтичну активність з придушенням росту пухлини і пролонгуванням виживаності з медіаною виживаності 71 день в порівнянні з 62 днями для бендамустину і 55 днями в контролях без лікування (дивись фігури 19a і 19b). EDO-S101, отже, як представляється, є особливо перспективним для лікування метастатичного раку мозку.

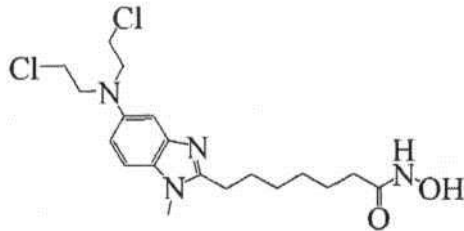
На закінчення експерименти показують, що здатність EDO-S101 проходити через гематоенцефалічний бар'єр є дуже хорошою. Це робить його перспективним кандидатом для лікування злоякісних пухлин головного мозку. Експериментальні дані, крім того, показують, що він активний не тільки проти MGMT-негативних GBMs, але також і проти MGMT-позитивних GBMs, що робить його дуже перспективним як терапевтичний агент для лікування MGMT-позитивних GBMs і інших MGMT-позитивних астроцитарних пухлин головного мозку, оскільки для них досі не було розроблено ніякого лікування. Продемонстровано також, що він значно пролонгує медіану виживаності у випадках як первинної лімфоми ЦНС, так і метастатичного раку головного мозку, що знов робить його дуже перспективним терапевтичним кандидатом для

обох станів. Дані також показують, що коли EDO-S101 вводять в поєднанні з променевою терапією, то він виявляє істотно поліпшену активність при лікуванні гліобластоми в порівнянні тільки з одним EDO-S101.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі

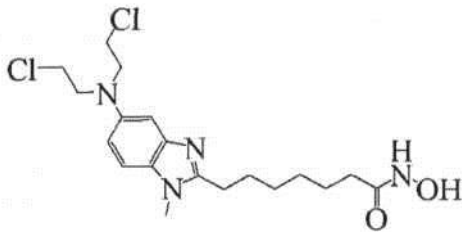


I

10

для виготовлення лікарського засобу для лікування раку головного мозку, вибраного з MGMT-позитивної астроцитарної пухлини головного мозку, метастатичного раку головного мозку і первинної лімфоми ЦНС.

2. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі



I

15

для виготовлення лікарського засобу для лікування MGMT-позитивної мультиформної гліобластоми.

3. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 1, де MGMT-позитивна астроцитарна пухлина головного мозку вибрана з дифузної астроцитомі (класу II WHO) і анапластичної астроцитомі (класу III WHO).

20

4. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 1, де метастатичний рак головного мозку вибраний з метастатичного раку молочної залози, метастатичної системної лімфоми, метастатичного раку легені, метастатичної меланоми, метастатичної саркоми і метастатичного раку шлунково-кишкового тракту.

5. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 1, де метастатичний рак головного мозку являє собою метастатичний рак молочної залози.

25

6. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за будь-яким з пп. 1-5, де фармакологічно прийнятна сіль сполуки формули I являє собою гідрохлорид, гідробромід, гідรอยодид, сульфат, бісульфат, сульфамат, нітрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, саліцилат, лактат, нафталінсульфонат або ацетат.

30

7. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за будь-яким з пп. 1-6 для виготовлення лікарського засобу, адаптованого для внутрішньовенного введення хворому, який потребує цього, на рівні дозування від 0,1 мг/кг до 70 мг/кг маси тіла хворого.

8. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 7 для виготовлення лікарського засобу, адаптованого для внутрішньовенного введення хворому, який потребує цього, на рівні дозування від 0,5 мг/кг до 50 мг/кг маси тіла хворого.

35

9. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 7 або п. 8 для виготовлення лікарського засобу, адаптованого для внутрішньовенного введення хворому, який потребує цього, на 1, 8 і 15 дні циклу лікування, на 1 і 8 дні циклу лікування або тільки на 1 день циклу лікування.

40

10. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для застосування при лікуванні раку головного мозку за будь-яким з пп. 1-9, де хворий, який потребує цього, отримує променевою терапією або до, або після лікування вказаного раку головного мозку вказаним лікарським засобом.

11. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для застосування при лікуванні раку головного мозку за п. 10, де хворий, який потребує цього, отримує променеву терапію до лікування вказаного раку головного мозку вказаним лікарським засобом.

5 12. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для застосування при лікуванні раку головного мозку за будь-яким з пп. 1-9, де хворий, який потребує цього, отримує лікування сполукою формули I або її фармакологічно прийнятною сіллю і променевою терапією.

10 13. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за будь-яким з пп. 10-12, де лікування опроміненням відбувається в дозі від 1 до 5 Гр протягом 5 послідовних днів, і переважно 2 Гр протягом 5 послідовних днів.

14. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку головного мозку за будь-яким з пп. 1-13, де лікування додатково включає введення інгібітору фактора росту ендотелію судин (VEGF), і сполука формули I або її фармацевтично прийнятна сіль і інгібітор фактора росту ендотелію судин (VEGF) можуть бути введені одночасно, послідовно або окремо.

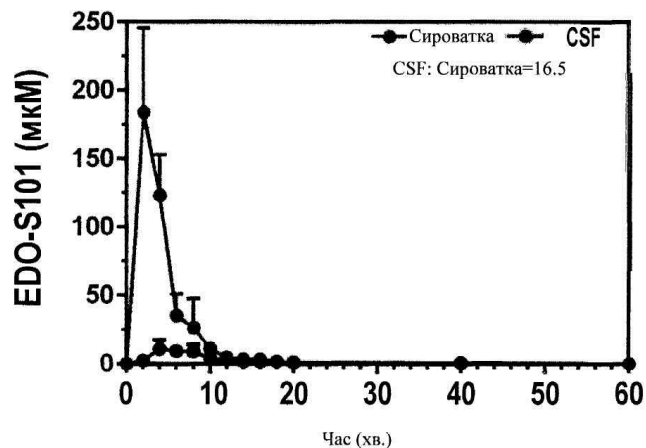
15 15. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 14, де вказаний інгібітор фактора росту ендотелію судин (VEGF) являє собою бевацизумаб.

20 16. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку головного мозку за будь-яким з пп. 1-13, де лікування додатково включає введення інгібітору полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP), і сполука формули I або її фармакологічно прийнятна сіль і інгібітор полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) можуть бути введені одночасно, послідовно або окремо.

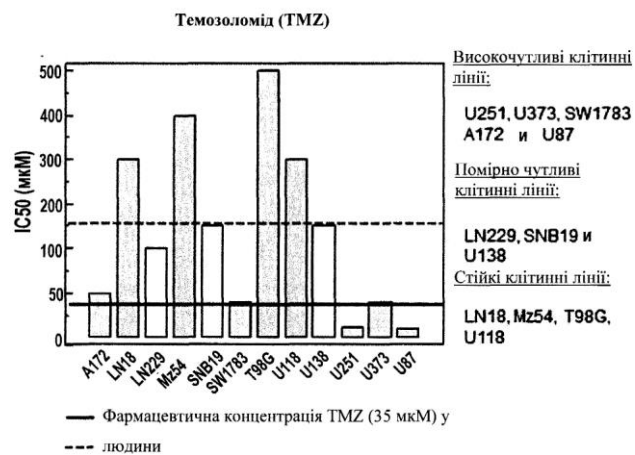
25 17. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 16, де вказаний інгібітор полі-(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) вибраний з рукапарibu, олапарibu і веліпарibu.

30 18. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування раку головного мозку за будь-яким з пп. 1-13, де лікування додатково включає введення інгібітору PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки), і сполука формули I або її фармакологічно прийнятна сіль і інгібітор PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки) можуть бути введені одночасно, послідовно або окремо.

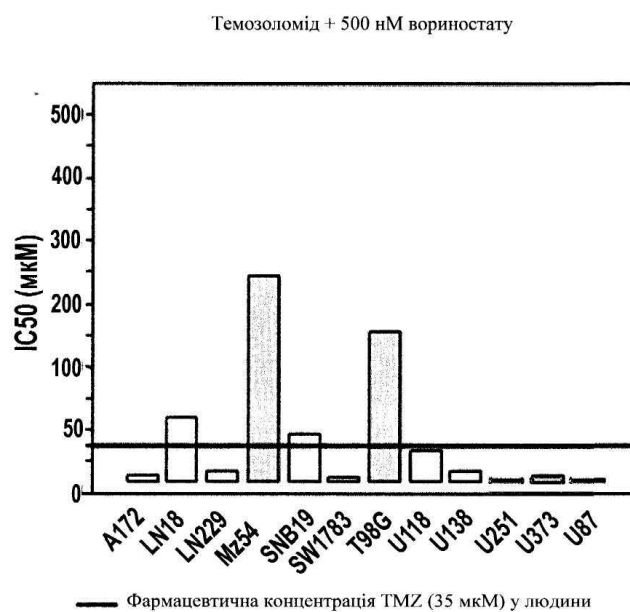
19. Застосування сполуки формули I або її фармакологічно прийнятної солі за п. 18, де вказаний інгібітор PD-1/PDL-1 (імунної контрольної точки) являє собою іпілімумаб.



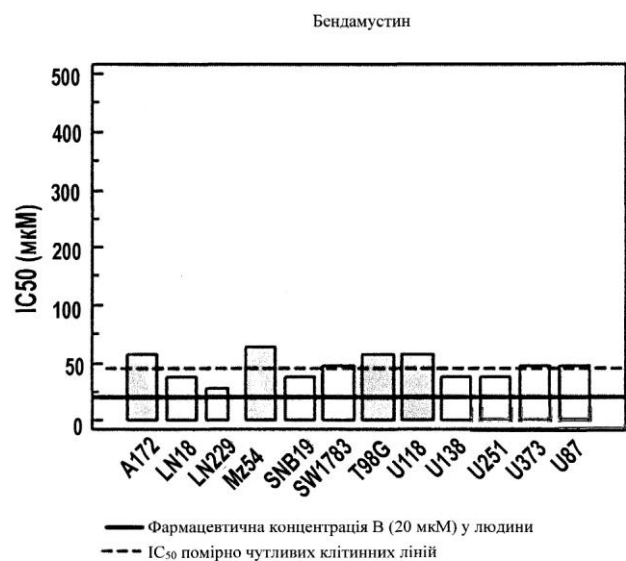
Фіг. 1



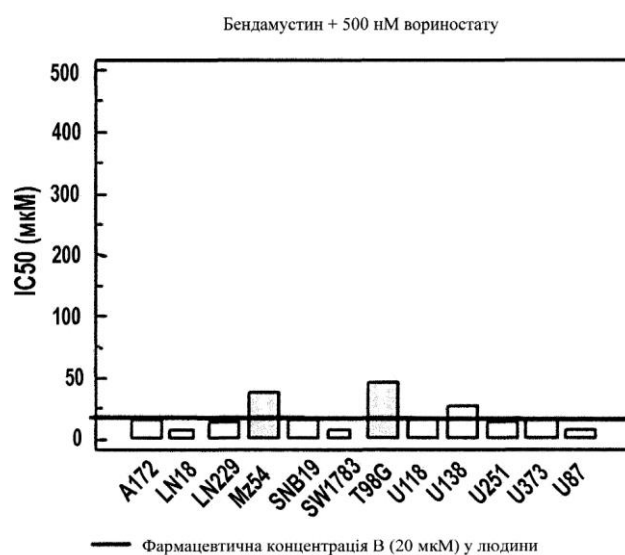
Фіг. 2



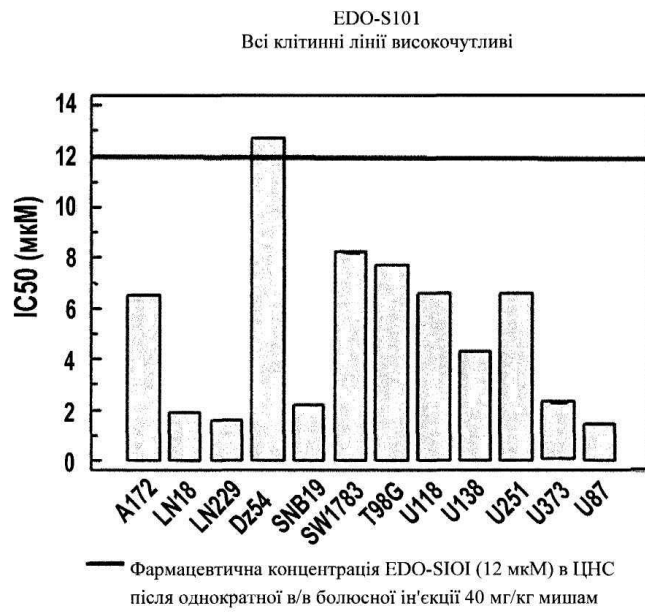
Фіг. 3



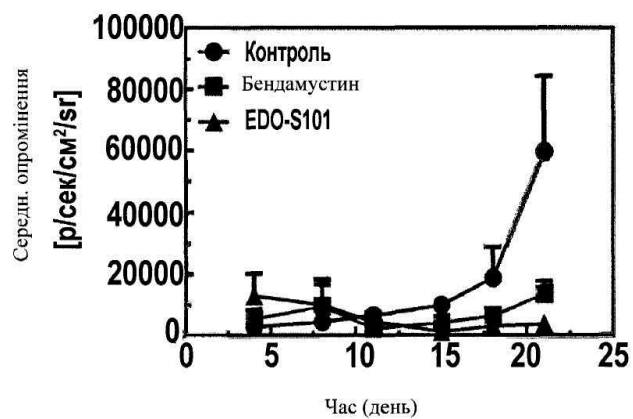
Фіг. 4



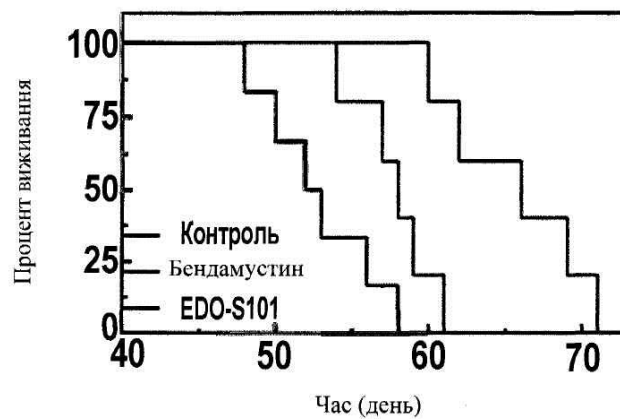
Фіг. 5



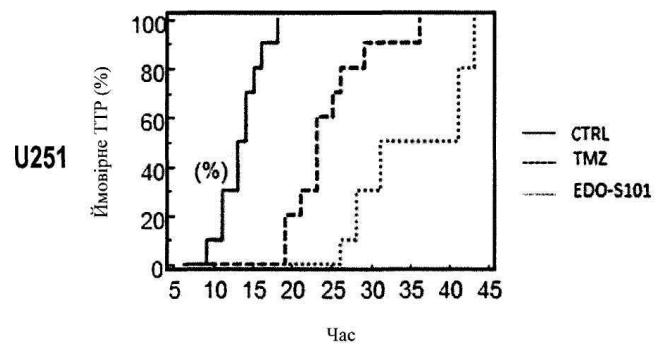
Фіг. 6



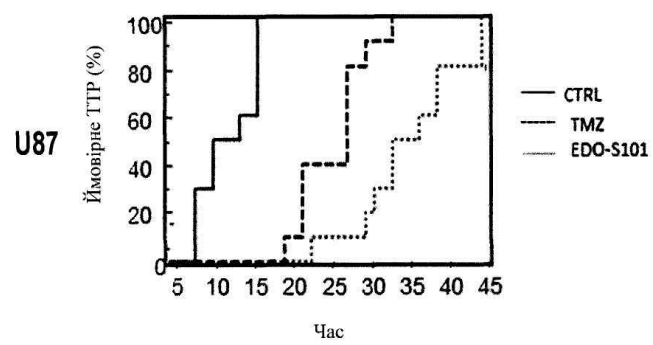
Фіг. 7A



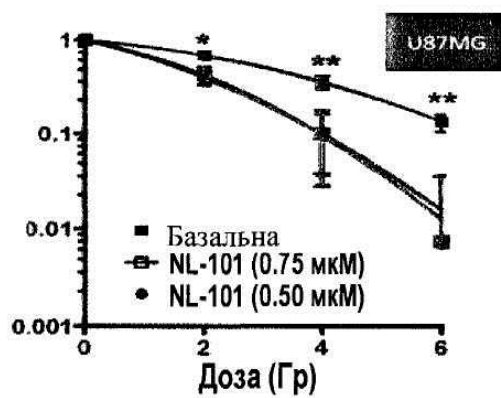
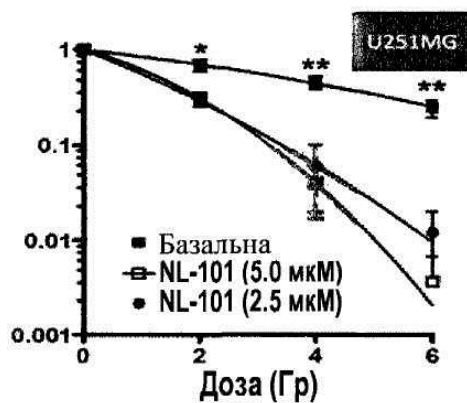
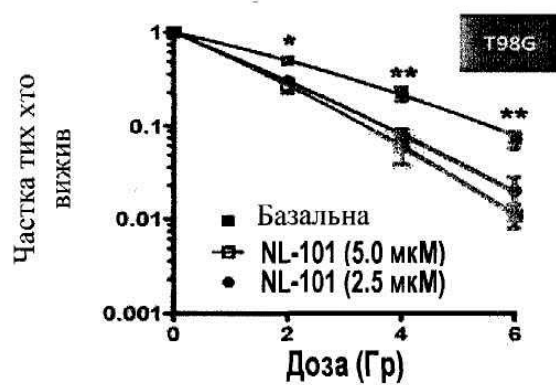
Фіг. 7b



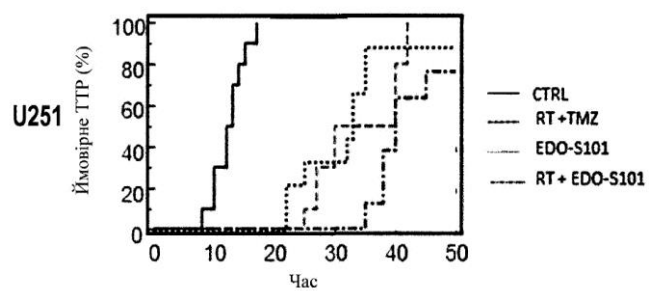
Фіг. 8



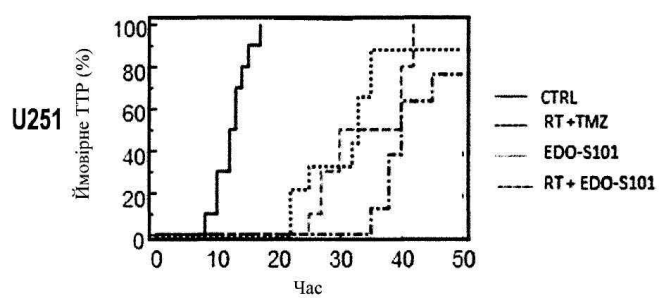
Фіг. 9



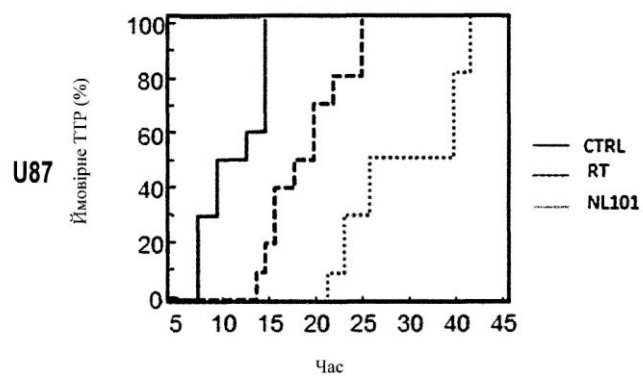
Фіг. 10



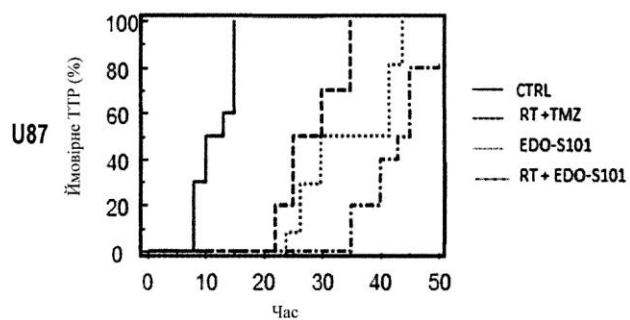
Фіг. 11



Фіг. 12



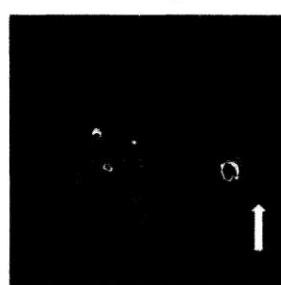
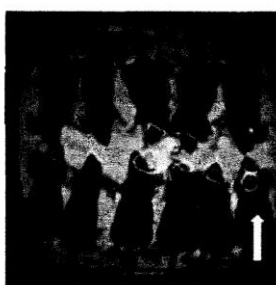
Фіг. 13



Фіг. 14

Контроль
(8/11 з пухлиною, 72,7%)
50 днів - закінчення лікування

EDO-S101
(5/13 з пухлиною, 38,5%)
50 днів - закінчення лікування



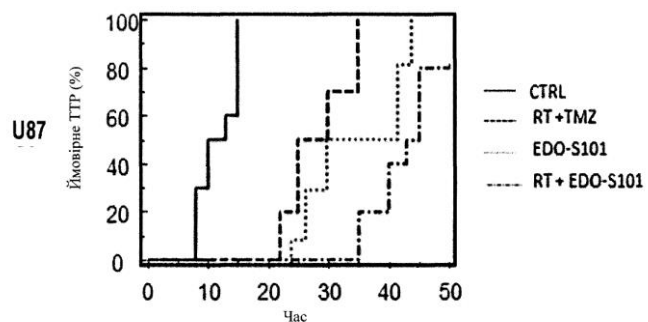
Фіг. 15

RT-TMZ
(2/11 з пухлиною, 18,2%)
закінчення лікування через 50 днів

TMZ
(3-5/13 з пухлиною, 23,1-38,5%)
закінчення лікування через 50 днів



Фіг. 16



Фіг. 17

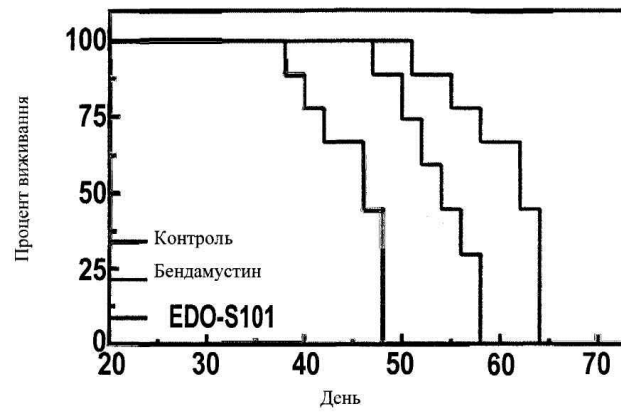


Fig. 18

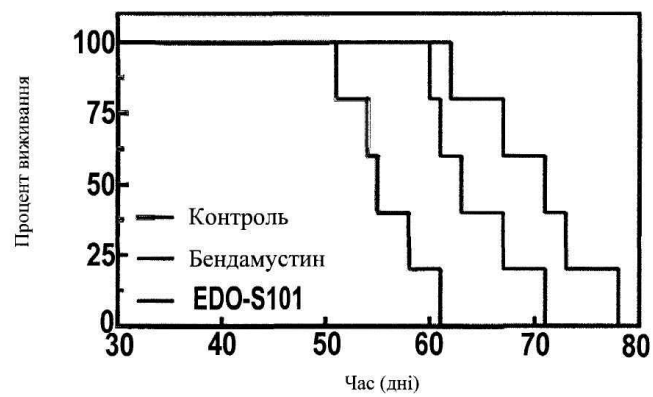


Fig. 19

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601