



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96614** (13) **C2**
(51) **МПК (2011.01)**
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/131 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) КОМБІНАЦІЇ АНТИФОЛАТНОГО АГЕНТА У ЛІКУВАННІ РАКУ

1

2

(21) а200907128
(22) 21.12.2007
(24) 25.11.2011
(86) PCT/US2007/088666, 21.12.2007
(31) 60/877,836
(32) 29.12.2006
(33) US
(31) 60/883,266
(32) 03.01.2007
(33) US
(31) 60/883,959
(32) 08.01.2007
(33) US
(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.
(72) ТЕУЕР ЧАРЛЬЗ П., US, АДАМС БОНН
ДЖЕЙН, US
(73) ТРАКОН ФАРМАСЮТИКАЛС, ІНК., US
(56) CN 1846679 A, 18.10.2006
WO 03070234 A1, 28.08.2003
GERSON S.L. ET AL // 458 INVITED Base excision
repair inhibition: a new target for cancer therapy //
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER.
SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, Gb. - vol. 4,
no. 12. - 1 November 2006 (2006-11-01). - P.140-
141
RICHARDS R.G. ET AL / Misincorporation of
deoxyuridine in human cells: consequences of
antifolate exposure // BASIC LIFE SCIENCES. -
1985, vol. 31. - 1985, P. 149-162
(57) 1. Застосування і) першої композиції, що міс-
тить пеметрексед, та ii) другої композиції, що міс-
тить метоксіамін, для комбінованого лікування
пацієнта, у якого діагностовано рак, вибраний з
групи: рак немалих клітин легень, колоректальний
рак та рак молочної залози, де співвідношення
метоксіаміну та пеметрекседу є між 1:2 та 1:100.
2. Застосування за п. 1, де вказаний пеметрексед
формують для внутрішньовенного або перораль-
ного застосування.
3. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний метоксіамін формують для внутріш-
ньовенного або перорального застосування.
4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний метоксіамін формують для перораль-
ного застосування.

5. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний метоксіамін та вказаний пеметрексед
застосовують послідовно.
6. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний метоксіамін застосовують перед пе-
метрекседом.
7. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, де вказа-
ний пеметрексед застосовують перед метоксіамі-
ном.
8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний пеметрексед у вказаній першій компо-
зиції є гептагідратом динатрієвої солі пеметрексе-
ду.
9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів,
де вказаний метоксіамін формують у кількості,
достатній для сенсibiliзації вказаного раку до
вказаного пеметрекседу.
10. Застосування за будь-яким з попередніх пунк-
тів, де вказаний метоксіамін та вказаний пеметре-
ксед досягають синергічної дії при застосуванні до
пацієнта.
11. Застосування за будь-яким з попередніх пунк-
тів, де вказаний метоксіамін застосовують раз або
двічі на добу.
12. Застосування за будь-яким з попередніх пунк-
тів, де вказаний пацієнт є таким, що має рак, част-
ково або повністю резистентний до лікування тіль-
ки пеметрекседом, та де вказаний другий
медикамент, що містить метоксіамін, формують у
кількості, ефективній для посилення активності
пеметрекседу та подолання вказаної резистентно-
сті при застосуванні до пацієнта.
13. Застосування за будь-яким з попередніх пунк-
тів, де співвідношенням метоксіаміну та пеметрек-
седу є співвідношення приблизно між 1:10 та 1:50;
приблизно між 1:15 та 1:40; та приблизно між 1:20
та 1:30.
14. Застосування за будь-яким з попередніх пунк-
тів, де вказаний пеметрексед формують у межах
доз приблизно від 25 до 200 мг/м² площі поверхні
тіла; приблизно від 150 до 500 мг/м² площі повер-
хні тіла; приблизно від 400 до 1000 мг/м² площі
поверхні тіла; приблизно від 900 до 5000 мг/м²
площі поверхні тіла; приблизно від 200 до 1000
мг/м² площі поверхні тіла; та приблизно від 500 до
600 мг/м² площі поверхні тіла.

(19) **UA** (11) **96614** (13) **C2**

Ця заявка претендує на пріоритет відносно попередньої заявки США № 60/877836, від 29,12,2006, Theuer et al., під назвою "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER," попередньої заявки США № 60/883,266, від 03,01,2007, Theuer et al., під назвою "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER," та попередньої заявки США № 60/883,959, від 08,01,2007, Theuer et al., під назвою "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER," котрі є уведеними як посилання, у тому числі будь-які фігури.

Заявлений винахід загалом стосується сполук, що мають різні переваги, у тому числі у застосуванні у дослідженнях, діагностиці та терапії. Більш конкретно, описані та запропоновані тут композиції, що містять метоксіамін та антиметаболітний антираковий агент, та способи лікування деяких типів раку застосуванням цих композицій.

Рак є всесвітньою проблемою, а тому визначення нових композицій та способів лікування раку має великий інтерес. Лікування раку охоплює три загальні категорії: хіміотерапія, радіаційна терапія та хірургія. Часто, терапії комбінують, оскільки комбінація терапій часто збільшує ймовірність знищення раку порівняно зі стратегіями лікування поодиноким методом. Звичайно, хірургічне видалення пухлин великої маси супроводжують хіміотерапією та/або радіаційною терапією.

Хіміотерапевтичні агенти можуть діяти кількома шляхами. Наприклад, хіміотерапевтичні агенти можуть діяти взаємодією з перебігом клітинного циклу або створенням розривів ланцюга ДНК. Якщо клітина раку не є здатною подолати блокаду клітинного циклу або пошкодження клітини, викликане терапевтичною сполукою, клітина часто гине за механізмами апоптозу. Застосування поодиноким хіміотерапевтичним агентом у лікуванні раку, з хірургією або радіацією чи без них, має кілька недоліків. Звичайно, клітини раку виявляють резистентність до хіміотерапевтичного агента. Така резистентність призводить до потреби у вищих дозах ліків та/або поновлення росту раку. Хіміотерапевтичні агенти можуть бути токсичними для пацієнта. Тому, є практичне вище обмеження кількості, яку пацієнт може отримувати. Однак, якщо можна розробляти другий агент для інгібування провідного шляху, що викликає резистентність, клітини раку можуть ставати сприйнятливими до дії хіміотерапевтичного агента.

Створення ліків для подолання резистентності до хіміотерапевтичного лікування раку слід робити з метою 1) визначення комбінації, що усуває резистентність та не просто поліпшує активність хіміотерапевтичного агента відносно активності стосовно пухлин, та 2) визначення других ліків, що не посилюють токсичну дію першого хіміотерапевтичного агента. Ці умови потребують великої кількості емпіричних тестувальних агентів, відомих як такі, що мають антиракові властивості, з агентами, що можуть мати антиракові властивості, або мо-

жуть посилювати перший агент іншим шляхом. На жаль, такі підходи таким чином доказані значною мірою як невдалі для комбінації багатьох антиракових агентів.

Тому, нема достатньої терапії, що усуває резистентність до хіміотерапії для лікування раку.

Винаходи, описані та заявлені тут, мають багато ознак та втілень у тому числі, але без обмеження, описані або згадані тут. Винаходи, описані та заявлені тут не є обмеженими особливостями або втіленнями, ідентифікованими тут, котрі є тільки ілюстрацією, а не обмеженням.

Ці та інші аспекти та втілення описаних та заявлених винаходів тут будуть зрозумілими з опису та формули винаходу.

Розкритими тут є композиції та способи, корисні у лікуванні деяких типів раку. Зокрема, ця заявка базується на раніше невідомому визначенні, що деякі молекули, що спрямовують абазичні ураження або АП (апуринові/апиримідинові) сайти у ДНК поліпшують або посилюють ефективність антиметаболітних антиракових агентів. В інших втіленнях інгібітор шляху видалення основ, як-то метоксіамін, комбінують з антиметаболітним антираковим агентом. Антиметаболітний антираковий агент є хіміотерапевтичним зі структурою, подібною речовині (метаболіту), потрібній для нормальних біохімічних реакцій, ще достатньо відмінних для взаємодії з нормальними функціями клітин, у тому числі поділом клітин. Антифолатні агенти є кращим класом антиметаболітних агентів. Антифолатний антираковий агент є хіміотерапевтичним зі структурою, подібною фолієвій кислоті, ще достатньо відмінною для блокування активності фолієвої кислоти та порушення залежних від фолатів механізмів, необхідних для реплікації клітин. Ці антифолатні антиракові агенти охоплюють пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, РТ523, та триметрексад. Застосування будь-якого антифолатного антиракового агента у комбінації з інгібітором BER (репарація видаленням основ) є розглянутим. В одному аспекті спосіб полягає у забезпеченні наступного: i) суб'єкт, у якого діагностовано рак, ii) перша композиція, що містить антифолатний антираковий агент та iii) друга композиція, що містить метоксіамін; застосування вказаної першої композиції до вказаного суб'єкта; та застосування вказаної другої композиції до вказаного суб'єкта, де метоксіамін застосовують у кількості, достатній для посилення або збільшення дії антифолатного антиракового агента. Другу композицію можна застосовувати перорально. У ще одному аспекті спосіб полягає у забезпеченні наступного: i) пацієнт, у якого діагностовано рак, де вказаний рак є принаймні частково резистентним до лікування тільки пеметрекседом, ii) перша композиція, що містить пеметрексед; та iii) друга композиція, що містить метоксіамін; застосування вказаної першої композиції до вказаного пацієнта; та застосування вказаної другої композиції до вказаного пацієнта, де метоксіамін застосовують у кіль-

кості, достатній для посилення активності вказаного пеметрекседу, та долають вказану резистентність. У цих способах метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати як композицію. Також, метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати послідовно, у будь-якому порядку. Також, метоксіамін можна застосовувати перорально, а антифолатний антираковий агент можна застосовувати перорально або внутрішньовенно. Також, кількість вказаного метоксіаміну може бути кількістю, достатньою для сенсibilізації клітин раку без виклику надмірної сенсibilізації нормальних клітин. Також, метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати для досягнення синергічної дії. Також, антифолатний антираковий агент можна застосовувати перорально або внутрішньовенно, а вказаний метоксіамін можна застосовувати перорально, не більше, ніж двічі на добу, у кількості, достатній для посилення активності вказаного антифолатного антиракового агента. Також, пацієнта можна вибрати як такого, що має рак, принаймні частково резистентний до лікування тільки антифолатним антираковим агентом, де вказану другу композицію, що містить метоксіамін, застосовують у кількості, ефективній для посилення активності вказаного антифолатного антиракового агента та долають вказану резистентність. Також, співвідношення вказаного метоксіаміну до вказаного антифолатного антиракового агента може бути між 1:5 та 1:500, переважно між 1:15 та 1:40, та навіть краще приблизно між 1:20 та приблизно 1:30. Також, рак можна вибрати з групи: карциноми, меланоми, саркоми, лімфоми, лейкомії, астроцитоми, гліоми, злоякісні меланоми, хронічна лімфоцитна лейкомія, типи раку легень, колоректальні типи раку, типи раку яєчника, типи раку підшлункової залози, типи раку нирок, типи раку ендометрію, типи раку шлунку, типи раку печінки, типи раку голови та шиї, та типи раку молочної залози. У кращих втіленнях антифолатним антираковим агентом є пеметрексед.

У ще одному втіленні розкрито поліпшений спосіб лікування раку у пацієнта, у котрого діагновано рак, який полягає у застосуванні антифолатного антиракового агента до пацієнта, поліпшення полягає у застосуванні метоксіаміну до пацієнта у кількості, достатній для посилення токсичності вказаного антифолатного антиракового агента. Також розкритими є антиракові композиції, що містять дозовану форму, що містить пеметрексед та дозовану форму, що містить синергічну кількість метоксіаміну, та способи застосування такої композиції згідно з розкритими способами лікування. У ще одному втіленні є розкритим поліпшене застосування метоксіаміну, застосування антифолатного антиракового агента для лікування раку у пацієнта, поліпшення полягає у застосуванні метоксіаміну у кількості, достатній для посилення токсичності вказаного антифолатного антиракового агента у вказаного пацієнта.

В одному аспекті заявлений винахід базується на раніше невідомому визначенні, що деякі молекули, як-то метоксіаміну, що спрямовують АП-сайти, є повністю перорально біопридатними та

підтримують мінімальні ефективні концентрації при пероральному застосуванні раз або двічі на добу. Антиракові агенти є звичайно застосовуваними як внутрішньовенний болюс, оскільки вони рідко добре поглинаються зі шлунково-кишкового тракту. Внутрішньовенне дозування має недоліки. По-перше, внутрішньовенна ін'єкція хіміотерапії потребує лікування у лікарні. По-друге, внутрішньовенну терапію звичайно застосовують як болюс, що призводить до дуже високої, але тимчасової дії ліків. Деякі антиракові агенти можуть бути найактивнішими після безперервного піддавання дії, що можна досягти за допомогою повторюваних пероральних доз. Це особливо стосується агентів, що інгібують механізми резистентності до хіміотерапії, де подовжене інгібування шляхів резистентності може бути необхідним для потрібної корисної дії. Подовженої дії ліків можна досягти, застосовуючи безперервне внутрішньовенне застосування. Однак, застосування антиракових агентів безперервним впливанням потребує складної апаратури для вливання ліків та внутрішньовенної катетеризації. Пероральне застосування позбавляє від необхідності безперервного внутрішньовенного впливання та є шляхом застосування кращого для пацієнтів. Однак, за нашими відомостями, інгібітори BER, що усувають резистентність до хіміотерапії та мають майже повну пероральну біопридатність, оскільки запропоновані тут не були розробленими досі.

Пеметрексед є багатоспрямованим антифолатним агентом, що діє у стилі, що є механістично відмінним від 5-FU та інших раніше створених антиметаболітів. Пеметрексед є унікальним тим, що він є піролопіримідиновим антифолатним аналогом, що внутрішньоклітинно метаболізується до вищих поліглютаматних форм за допомогою фолілоліглютамат-синтетази (FPGS). Пентаглютаматна форма є домінуючим внутрішньоклітинним біотипом та поліглютамати пеметрекседу є приблизно 60-кратно більш потужними, ніж вихідний моноглютамат; поліглютамати пеметрекседу також виявляють подовжене клітинне утримання. Звідси, фармакологічна дія пеметрекседу утримується протягом багатьох діб після внутрішньовенного болюсного застосування.

Пеметрексед інгібує тимідилат-синтазу (TS), дигідрофолат-редуктазу (DHFR) та гліцинамід-рибонуклеотид-формілтрансферазу (GARFT), усі залежні від фолатів ферменти приймають участь у біосинтезі нуклеотидів тимідину та пурину. На відміну, 5-FU та інші раніше створені антиметаболіти спочатку інгібують тільки TS. Точний механізм, котрим пеметрексед викликає загибель клітин є ще невідомим, але охоплює більше, ніж інгібування TS. Звідси, тоді як у гетерогенній панелі невибраних ліній клітин раку товстої кишки людини, найкращим прогностувальником сенситивності до 5FU була TS-активність, ряд детермінантів сенситивності були важливими для пеметрекседу, у тому числі FPGS-активність та кінетика TS-ферменту (van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y. Thymidylate synthase level as the main predictor parameter for sensitivity to 5-FU, but not for Folate-based Thymidylate Synthase Inhibitors, in 13

Nonselected Colon Cancer Cell Lines. Clin. Cancer. Res. 1999; 5:643-54). Наступне дослідження підтверджувало, що чутливість ліній шлунково-кишкових клітин до пеметрекседу не могла б бути прогнозованою за експресією TS (Kim JH, Lee KW, Jung Y et al. Cytotoxic effects of pemetrexed in gastric cancer cells. Cancer Sci. 2005; 96:365-71).

Унікальна фармакологічна активність пеметрекседу стає ясною з дослідження *in vitro* активності на ряді ліній клітин раку порівняно з 5-FU. У серії з 13 ліній клітин раку товстої кишки, наприклад, пеметрексед був від 18 до 627-разів більш потужним, ніж 5-FU (van Triest et al., 1999). Це унікальна фармакологія, і факт, що пеметрексед, можна вважати, має ряд механізмів дії, що не є повністю зрозумілими, робить важким визначення, яким ефективним він міг би бути при комбінуванні з іншими конкретними антираковими агентами для лікування певних типів раку.

Одним аспектом заявленого винаходу є визначення неочікуваного поліпшення у лікуванні типів раку комбінованим застосуванням метоксіаміну з антифолатною сполукою. Таким чином, одне описане тут втілення є спрямованим на способи, що полягають у забезпеченні наступного: i) пацієнт, у котрого діагностовано рак, ii) перша композиція, що містить антифолатний антираковий агент та iii) друга композиція, що містить метоксіамін; застосування першої композиції до пацієнта; та застосування другої композиції до вказаного пацієнта, де метоксіамін можна застосовувати у кількості, достатній для посилення або збільшення дії (тобто посилення активності) антифолатного антиракового агента. Будь-який антифолатний антираковий агент можна застосовувати, за умови, що у деяких втіленнях способу, 5-FU є конкретно вилученим. У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, едатрексат, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексат, аміноптерин, 5,10-Дідеазатетрагідрофолієва кислота (DDATHF), піритрексим, ралітрексед, GW1843 [(S)-2-[5-[(1,2-дигідро-3-метил-1-оксобензо[*f*]хіназолін-9-іл)метил]аміно-1-оксо-2-ізоіндолініл]-глутарова кислота], їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, едатрексат, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексат, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль, гептагідрат.

У загальному, але необмежувальному втіленні антифолатним антираковим агентом є пеметрексед. Метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати послідовно (у будь-якому порядку) або застосовувати послідовно (у будь-якому порядку) або застосовувати разом як композицію. Пеметрексед можна, наприклад, застосовувати внутрішньовенно у дозі між 200 та 1000 мг/м² площі поверхні тіла на добу, або у дозі між 500 та 600 мг/м² площі поверхні тіла на добу. У

ще одному втіленні співвідношення метоксіаміну до антифолатного антиракового агента може бути між 1:5 та 1:500.

У ще одному аспекті метоксіамін можна застосовувати перорально у кількості, достатній для чутливізації раку без виклику надмірної чутливізації нормальної тканини. У необмежувальних кращих втіленнях метоксіамін застосовують перорально так, що він має значно підсилену біопридатність відносно інших антиракових агентів, застосовуваних перорально. В інших необмежувальних кращих втіленнях метоксіамін застосовують перорально так, щоб він підтримував мінімальну ефективну концентрацію при дозуванні раз на добу або двічі на добу. Одним шляхом для виміру пероральної біопридатності є порівняння досягнутих рівнів проти рівнів внутрішньовенно застосовуваного метоксіаміну. Таким чином у ще одному аспекті заявленого винаходу, метоксіамін застосовують перорально для отримання біопридатності принаймні 50% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 60% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 70% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 75% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 80% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 85% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 90% відносно внутрішньовенного застосування, принаймні 95% відносно внутрішньовенного застосування, або приблизно еквівалентно внутрішньовенному застосуванню. Це важливо для визначення, що на додаток до неочікувано високого ступеню біопридатності, досягнутого пероральним застосуванням, порівняно з внутрішньовенним застосуванням метоксіаміну, більш бажаний профіль рК отримують порівняно з внутрішньовенним застосуванням метоксіаміну. У ще одному аспекті заявленого винаходу, перорально застосовуваний метоксіамін підтримує мінімальну ефективну концентрацію після застосування раз або двічі на добу внаслідок періоду напівперетворення > 4 годин у плазмі. Ця перевага дозволяє бажаний режим перорального дозування для метоксіаміну, у тому числі раз або двічі на добу. Тоді як внутрішньовенне застосування пеметрекседу, комбіноване з пероральним застосуванням метоксіаміну, є необмежувальним кращим втіленням, інші шляхи застосування є розглянутими для кожного з антиракових агентів.

У ще одному аспекті винаходу, способи є запропонованими для лікування деяких типів раку, що є резистентними до лікування тільки антираковим агентом. Відповідно, також запропоновані способи, що полягають у забезпеченні наступного: i) пацієнт, у котрого діагностовано рак, де вказаний рак може бути резистентним до лікування тільки пеметрекседом, ii) перша композиція, що містить антифолатний антираковий агент; та iii) друга композиція, що містить метоксіамін;

застосування першої композиції до пацієнта; та

застосування другої композиції до пацієнта, де метоксіамін можна застосовувати у кількості, достатній для посилення або збільшення дії (тобто посилення токсичності) антифолатного антирако-

вого агента. В одному втіленні, антифолатним антираковим агентом може бути пеметрексед. Метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати послідовно (у будь-якому порядку) або застосовувати разом як композицію. Пеметрексед можна застосовувати внутрішньовенно у дозі між 200 та 1000 мг/м² площі поверхні тіла на добу, або у дозі між 500 та 600 мг/м² площі поверхні тіла на добу. Співвідношення пеметрекседу до метоксіаміну може бути між 1:5 та 1:500. У ще одному втіленні кількість метоксіаміну можна застосовувати перорально у кількості, достатній для сенсibilізації раку без виклику надмірної сенсibilізації нормальної тканини. У ще одному втіленні кількість метоксіаміну можна застосовувати перорально раз на добу або двічі на добу у кількості, достатній для сенсibilізації раку без виклику надмірної сенсibilізації нормальної тканини. Тоді як пероральне застосування метоксіаміну є неочікувано кращим шляхом застосування, інші типи застосування є можливими.

Ще одне втілення є спрямованим на спосіб лікування раку забезпеченням першої та другої композиції, де вказані перша композиція містить антифолатний агент, а друга композиція містить перорально застосовуваний метоксіамін. Першу композицію, що містить антифолатний агент можна застосовувати звичайними шляхами застосування, у тому числі внутрішньовенно. Необмежувальним кращим антифолатним агентом є пеметрексед. Відповідно, в одному втіленні антифолатним агентом є пеметрексед, а другу композицію, що містить метоксіамін, застосовують перорально у кількості, що є синергічно ефективною порівняно з лікуванням тільки пеметрекседом.

У ще одному аспекті спосіб можна застосовувати для лікування типів раку, що є резистентними до пеметрекседу поодиночі. Згідно з цими втіленнями пеметрексед застосовують у кількості, що усуває резистентність (та є тому синергічною) до антифолатного агента поодиночі. Таким чином в одному втіленні метоксіамін застосовують перорально у кількості, ефективній для посилення або збільшення токсичності пеметрекседу та долають резистентність раку до лікування пеметрекседом. Наприклад, ефективність пеметрекседу для лікування раку може бути зменшеною внаслідок розвитку резистентності протягом циклу лікування, застосування метоксіаміну може обійти розвинену резистентність, забезпечуючи більше, ніж адитивну дію стосовно лікування раку метоксіаміном або пеметрекседом поодиночі.

Також є запропонованими способи, що полягають у забезпеченні наступного: i) пацієнт, у якого діагновано рак, де рак можна вибрати з групи: карциноми, меланоми, саркоми, лімфоми, лейкої, астроцитомы, гліоми, злоякісні меланоми, хронічна лімфоцитна лейкоїя, типи раку легень, колоректальні типи раку, типи раку яєчника, типи раку підшлункової залози, типи раку нирок, типи раку ендометрію, типи раку шлунку, типи раку печінки, типи раку голови та шиї, та типи раку молочної залози, де рак може бути резистентним до лікування тільки пеметрекседом, ii) перша компо-

зиція, що містить антифолатний антираковий агент та iii) друга композиція, що містить метоксіамін;

застосування першої композиції до вказаного пацієнта; та

застосування другої композиції до вказаного пацієнта, де метоксіамін можна застосовувати у кількості, достатній для посилення або збільшення дії антифолатного антиракового агента. Метоксіамін та антифолатний антираковий агент можна застосовувати послідовно або застосовувати разом як композицію. Наприклад, метоксіамін можна застосовувати першим, а тоді антифолатний антираковий агент можна застосовувати останнім, або антифолатний антираковий агент можна застосовувати першим, а метоксіамін можна застосовувати останнім.

У загальному втіленні антифолатним антираковим агентом може бути пеметрексед. Пеметрексед можна застосовувати внутрішньовенно у дозі між 200 та 1000 мг/м² площі поверхні тіла на добу, або у дозі між 500 та 600 мг/м² площі поверхні тіла на добу. Співвідношення пеметрекседу до метоксіаміну може бути між 1:5 та 1:500. У ще одному втіленні кількість метоксіаміну можна застосовувати перорально у кількості, достатній для виклику сприйнятливості ракових клітин до лікування антираковим агентом (тобто сенсibilізації) без виклику надмірного пошкодження нормальних клітин. У ще одному втіленні кількість метоксіаміну можна застосовувати перорально раз або двічі на добу у кількості, достатній для сенсibilізації раку без виклику надмірної сенсibilізації нормальної тканини.

Ще одним втіленням може бути композиція, що містить метоксіамін та антифолатний антираковий агент, де метоксіамін можна застосовувати у кількості, достатній для посилення токсичності антифолатного антиракового агента. Переважно, антифолатним антираковим агентом є пеметрексед.

У ще одному втіленні співвідношення метоксіаміну до антифолатного антиракового агента може бути між 1:5 та 1:500 у будь-якому зі способів, описаних вище.

У ще одному втіленні другий антираковий агент можна застосовувати до або після лікування метоксіаміном та антифолатним антираковим агентом у будь-якому зі способів, описаних вище.

У ще одному втіленні є описаним спосіб лікування раку у пацієнта, у якого діагновано рак, який полягає у застосуванні антиметаболітного антиракового агента до пацієнта, що має такі поліпшення: застосування метоксіаміну до пацієнта у кількості, достатній для посилення токсичності вказаного антиметаболітного антиракового агента. Антиметаболітний антираковий агент може бути антифолатним антираковим агентом. Антифолатним антираковим агентом може бути пеметрексед, а співвідношення вказаного метоксіаміну до антифолатного антиракового агента може бути між 1:5 та 1:500. Рак може бути резистентним до лікування тільки пеметрекседом.

Опис фігур

Фіг. Фіг. 1A-B показують дію пеметрекседо та MOA на розривах ланцюга ДНК, застосовуючи лужний (Фіг. 1A) та нейтральний (Фіг. 1B) кометний аналіз.

Фіг. Фіг. 1C-D показують порівняння довжини кометного хвоста між клітинами, обробленими пеметрекседом поодинокі або MOA поодинокі, та пеметрекседом плюс MOA у клітинах, підданих лужному (Фіг. 1C) та нейтральному (Фіг. 1D) кометним аналізам.

Фіг. 2 є схемою, що показує середнє значення концентрації MOA у плазмі від самців щурів Sprague-Dawley у відмінні моменти часу після поодинокого болюсного дозування MOA внутрішньовенним та пероральним застосуванням при 20 мг/кг маси тіла.

Фіг. 3 є схемою, що показує середнє значення концентрації MOA у плазмі від самиць щурів Sprague-Dawley у відмінні моменти часу після поодинокого болюсного дозування MOA внутрішньовенним та пероральним застосуванням при 20 мг/кг маси тіла.

Фіг. 4A є схемою, що показує відносну кількість АП-сайтів, визначених у клітинах H460 через 24 годин після лікування пеметрекседом та MOA.

Фіг. 4B є схемою, що показує відносну кількість АП-сайтів, визначених у клітинах H460 при 24 годинах, 48 годинах та 72 годинах.

Фіг. 5A показує схематичну діаграму отримання субстратів ДНК з регулярними АП-сайтами або MOA-АП-сайтами.

Фіг. 5B показує, що MOA-зв'язані АП-сайти є резистентними стосовно розщеплення АП-ендо-нуклеазою (АПЕ).

Фіг. 6 показує дію пеметрекседо та MOA у комбінації на розриві подвійного ланцюга ДНК та апоптоз.

Фіг. 7 показує дію пеметрекседо та MOA у комбінації на рівні BER-білку у клітинах H460.

Фіг. 8 показує дію пеметрекседо та MOA на серединний об'єм пухлин NCI-H460, пухлин A549, пухлин HCT116, та ріст пухлин MDA-MB-468 у безтуморних мишей.

Деякі втілення винаходу загалом стосуються нових композицій, що містять метоксіамін та антифолатний антираковий агент, та лікування деяких типів раку, застосовуючи ці композиції.

Визначення

Якщо не визначене інше, наступні терміни мають нижченаведені значення при застосуванні тут та у змінній формулі винаходу. Терміни, що не є визначеними нижче або будь-де в описі, мають їх визначені значення.

Термін "агент" та "ліки" є застосовуваними тут в описі та у формулі винаходу для визначення хімічних сполук, сумішей хімічних сполук, біологічних макромолекул, або екстракти з біологічних матеріалів як-то клітин або тканин бактерій, рослин, грибів або тварин, особливо ссавців, що очікувано мають терапевтичні властивості. Агент або ліки можна очищати, по суті очищати або частково очищати.

Термін "антиметаболіт" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення хіміо-

терапевтичного агенту зі структурою, подібною речовині (метаболіту, наприклад, нуклеозиду) потрібної для нормальних біохімічних реакцій, ще достатньо відмінних для взаємодії з нормальними функціями клітин, у тому числі поділом клітин.

Термін "антифолатний агент" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення хіміотерапевтичного агенту зі структурою, подібною фолієвій кислоті, ще достатньо відмінних для блокування активності фолієвої кислоти та порушення залежних від фолатів механізмів, необхідних для реплікації клітин. Як застосовано тут, антифолатні агенти є одним класом антиметаболітів.

Термін "antineoplastичний" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення хіміотерапевтичного агенту для інгібування або попередження розвитку та проліферації новоутворень (пухлин), що можуть ставати злоякісними, націлюванням ДНК.

Термін "проявлення" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення будь-яких відомих способів спеціалістам, що є застосовуваними для кращої візуалізації, розрізнення або ідентифікації певних компонентів та/або особливостей клітин або клітини.

Термін "в операбельній комбінації", "в операбельному порядку" та "операбельно зв'язаний" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення зв'язку послідовностей нуклеїнових кислот у такому стилі, щоб молекула нуклеїнової кислоти була здатною спрямовувати транскрипцію даного гена та/або синтез, щоб утворювати потрібну молекулу білку. Термін також стосується зв'язку послідовностей амінокислот у такому стилі, щоб утворювати функціональний білок.

Термін "антиген" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення білку, глікопротеїну, ліпопротеїну, ліпиду або іншої речовини, що є реактивними, антитілом специфічним для частини молекули.

Термін "морфологія" є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення візуального зовнішнього вигляду клітин або організму.

Термін "суб'єкт," "особа," та "пацієнт" є застосовуваними тут в описі та у формулі винаходу для визначення людини або іншої тварини (наприклад, морської свинки або мишей) здатних мати клітинний цикл визначеної хвороби, існуючої від народження або індукованої, у тому числі, але без обмеження, раку.

Термін "усуває резистентність" означає, що застосування другого агенту у комбінації з первинним хіміотерапевтичним агентом є здатним продукувати значне зменшення об'єму пухлини на рівні статистичної значності (наприклад, $p < 0,05$) при порівнянні з об'ємом нелікованої пухлини у випадку, де первинний хіміотерапевтичний агент поодинокі не є здатним продукувати статистично значне зменшення у об'єму пухлини порівняно з об'ємом нелікованої пухлини. Це загалом стосується вимірів об'єму пухлини, коли нелікована пухлина є зростаючою логарифмічно.

Термін "посилують", як застосовувано тут, означає посилення або збільшення корисної акти-

вності або ефективності антиракового агенту у порівнянні з очікуваними від антиракового агенту поодиночі або посилювального агенту поодиночі.

Термін "сенсibiliзація", як застосовувано тут, означає зміну клітини раку або пухлин клітини шляхом, що дає більш ефективне лікування асоційованої неопластичної хвороби антираковим агентом або радіаційною терапією. У деяких втіленнях нормальні клітини не вражаються до ступеню, що призводить нормальні клітини до надмірного пошкодження хіміотерапією або радіаційною терапією.

Термін "синергічна дія", як застосовувано тут, що означає комбіновану дію двох або більше антиракових агентів або хіміотерапевтичних ліків, може бути більше, ніж сумарна дія антиракових агентів або хіміотерапевтичних ліків поодиночі. Наприклад, комбінована дія інгібітору BER, як-то метоксіамін, та антиракового агенту, як-то пеметрексед, може бути більше, ніж сумарна дія метоксіаміну та пеметрекседу поодиночі.

Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки, що даватиме потрібну реакцію, наприклад, біологічну або медичну реакцію тканини, системи, тварини, або людини, що визначається, наприклад, дослідником, ветеринаром або лікарем.

Термін "природний тип" (пт) клітин або лінії клітин є застосовуваним тут в описі та у формулі винаходу для визначення клітин або лінії клітин, що зберігають характеристики, звичайно асоційовані з типом клітин або лінії клітин стосовно фізіологічного процесу або морфологічної характеристики, що досліджують. Припустимо для клітин або лінії клітин мати характеристики неприродного типу стосовно фізіологічного процесу або морфологічної характеристики, що не є дослідженими, доки вони не впливають помітно на процес або характеристики, що визначають.

Термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується солі сполуки, що не викликає значного подразнення організму, до якого її застосовують та не усуває біологічну активність та властивості сполуки. У деяких втіленнях сіль є кислотна адитивною сіллю сполуки. Фармацевтичні солі можна отримувати реакцією сполуки з неорганічними кислотами, як-то галідна кислота (наприклад, хлоридна кислота або бромідна кислота), сульфатна кислота, нітратна кислота, фосфатна кислота тощо. Фармацевтичні солі можна також отримувати реакцією сполук з органічною кислотою, як-то аліфатична або ароматична карбонова або сульфорова кислоти, наприклад, оцтова, бурштинова, молочна, яблучна, винна, лимонна, аскорбінова, нікотинова, метансульфонова, етансульфонова, п-толуенсульфонова, саліцилова або нафталінсульфонова кислота. Фармацевтичні солі можна також отримувати реакцією сполук з основою для утворення солі як-то амонію, лужного металу, як-то натрій або калій, лужноземельного металу, як-то кальцій або магній, сіль органічної основи, як-то дициклогексиламін, [N-метил-D-глюкамін, трис(гідроксиметил)метиламін, C₁-C₇ галогеналкіламін, циклогексиламін, триетаноламін, етилендіамін, та солі із амінокислотами як-то аргінін, лізин, тощо.

Пошкодження ДНК мінімізують ферментами, що визначають похибки, видаляють їх, та заміщують пошкоджену ДНК коригованими нуклеотидами. Пошкодження ДНК відбуваються при розриві одичного ланцюга, основа видаляється, залишаючи партнера неспареним, основа ковалентно модифікується, основа перетворюється в іншу, що не є прийнятно спареним з основою-партнером, або ковалентний зв'язок уводиться між основами на протилежних ланцюгах. Системи видалення основ видаляють помилково спарену або пошкоджену основу з ланцюга ДНК та тоді синтезують нову ДНК для її заміщення. Репарація видаленням основ (BER) починається при реплікації ДНК та дає коригування пошкоджених основи/помилково спарених основ до завершення реплікації.

Репарацію видаленням основ (BER) починає ДНК-глікозилаза, що видаляє N-глікозидні (основ-цукор) зв'язки, вивільняючи пошкоджену основу та створюючи абазичний сайт (наприклад, апуриновий або апіримідиновий (АП) сайт). Апуриновий або апіримідиновий (АП) сайт призводиться від втрати залишку пурину або піримідину, відповідно, від ДНК (дезоксирибонуклеїнової кислоти). Залишки урацилу можуть утворюватися від спонтанного деамінування цитозину та можуть призводити до переходу C→T. Є також глікозилаза, що визначає та видаляє гіпоксантин, продукт деамінування аденіну. Інші глікозилази видаляють галогеналкіловані основи (як-то 3-метиладенін, 3-метилгуанін, та 7-метилгуанін), пурини з відкритим кільцем, пошкоджені окисненням основи та у деяких організмах УФ-фотодимери. Урацил-ДНК-глікозилаза (UDG) є прикладом ДНК-глікозилази. Рівні BER-білку UDG реагують на лікування комбінацією пеметрекседу та MOA (Фіг. 7).

АП-сайт крім того переробляється 5'-3'-ендонуклеазою (АП-ендонуклеазою (АПЕ)), що вирізає фосфодіестерний зв'язок з обох боків пошкодженої основи пурину або піримідину. АП-ендонуклеази уводять розриви ланцюга розщепленням фосфодіестерних зв'язків на АП-сайтах.

PARP допомагає у процесингу розривів ланцюга ДНК, індукованих протягом BER. PARP є ДНК нік-контрольним білком, що слабо зв'язується з BER-інтермедіатами, коли поодинокі-нуклеотидна BER йде звичайно до завершення. На відміну, коли поодинокі нуклеотид BER блокується на етапі видалення, PARP сильно зв'язується з BER-інтермедіатом, разом з АП-ендонуклеазою (АПЕ), ДНК pol-β, та FEN-1.

У клітинах ссавців, цукор-фосфат 5'-дезоксирибози видаляють внутрішньою активністю АП-ліази (dRP) ДНК-полімерази β (pol β). ДНК-полімеразний фермент також заповнює гепи новими нуклеотидами.

Зрештою, ДНК-лігаза ковалентно зв'язує 3'-закінчення нового матеріалу зі старим матеріалом. Таким чином, послідовність природного типу зберігається.

Топоізомерази I та II є також залученими у відновленні ДНК, оскільки вони визначають спонтанні АП-сайти та утворюють стабільні розщеплювані комплекси. Інгібітори топоізомерази II сприяють розщепленню ДНК та іншим абераціям

хромосом, у тому числі обмінам сестринських хроматид.

Деякі втілення, які описано тут, можуть бути спрямованими на способи, що полягають у забезпеченні наступного: i) пацієнт, у котрого діагностовано рак, ii) перша композиція, що містить антифолатний антираковий агент та iii) друга композиція, що містить метоксіамін;

застосування першої композиції до пацієнта; та застосування другої композиції до вказаного пацієнта, де метоксіамін можна застосовувати у кількості, достатній для посилення або збільшення дії антифолатного антиракового агента. Будь-який антифолатний антираковий агент можна застосовувати, за умови, що у деяких втіленнях способу, 5-FU є специфічно вилученим.

У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, 5,10-Дідеазатетрагідрофолієва кислота (DDATHF), піритрексим, ралітрексед, GW1843 [(S)-2-[5-[(1,2-дигідро-3-метил-1-оксобензо[f]хіназолін-9-іл)метил]аміно-1-оксо-2-ізоіндолініл]-глутарова кислота],

їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

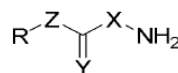
У деяких втіленнях заявлений винахід стосується застосування антиракового агента, що індукує утворення АП-сайтів, та інгібітору BER.

У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, 5,10-Дідеазатетрагідрофолієва кислота (DDATHF), піритрексим, ралітрексед, GW1843 [(S)-2-[5-[(1,2-дигідро-3-метил-1-оксобензо[f]хіназолін-9-іл)метил]аміно-1-оксо-2-ізоіндолініл]-глутарова кислота], їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін, етопозид (VP-16, VP-16-123), мезо-4,4'-(2,3-бутандііл)-біс-(2,6-піперазидин) (ICRF-193, бісдіоксопіперазин), доксорубіцин (DOX), амсакрин (4',9-

акридиніламінометансульфон-м-анізидид; mAMSA), пазеліптин, налідиксинова кислота, оксолінова кислота, новобіоцин, коумерміцин A1, фострієцин, теніпозид, мітоксантрон, даунорубіцин, N-[2-диметиламіно)етил]акридин-4-карбоксамід (DACA), мербарон, хінакрин, еліптицини, епіподофілотоксини, етидій бромід, епірубіцин, пірарубіцин, 3'-деаміно-3'-морфоліно-13-дезоксо-10-гідроксикарміноміцин; 2'',3''-біс-пентафлуорфеноксиацетил-4',6'-етиліден-бета-D-глюкозид солі 4'-фосфат-4'-диметилепіподофілотоксину з 2N-метилглюкаміном (F11782; флуорований ліпофільний епіподофілоїд), адриаміцин, актиноміцин D, антрацикліни (як-то 9-аміноантрациклін), піразолоакридин (PZA), камптотексин, топотекан, їх фармацевтичні солі та сольвати та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилmaleimід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA) або його солі.

В одному втіленні інгібітором BER можуть бути сполуки, що мають структури формули I:



Формула I

де X – O або NH,

Y – O, S, або NH,

Z є відсутнім або представленим O, S, або NH,

R – гідроген або вуглеводнева група, та

їх фармацевтично прийнятні солі.

У деяких втіленнях інгібітор BER можна застосовувати для лікування пацієнта або суб'єкта, що має неопластичну хворобу. Наприклад, неопластичною хворобою може бути рак, вибраний з групи: карциноми, меланоми, саркоми, лімфоми, лейкомії, астроцитоми, гліоми, злоякісні меланоми, хронічна лімфоцитна лейкемія, типи раку легень, рак простати, колоректальні типи раку, типи раку яєчника, типи раку підшлункової залози, типи раку нирок, типи раку ендометрію, типи раку шлунку, типи раку печінки, типи раку голови та ший.

У деяких втіленнях інгібітор BER можна застосовувати для лікування пацієнта або особи, що має неопластичну хворобу, яку лікують антираковим агентом.

У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін, етопозид (VP-16, VP-16-123), мезо-4,4'-(2,3-бутандііл)-біс-(2,6-піперазидин) (ICRF-193, бісдіоксопіперазин), доксорубіцин (DOX), амсакрин (4',9-акридиніламінометансульфон-м-анізидид; mAMSA), пазеліптин, налідиксинова кислота, оксолінова кислота, новобіоцин, коумерміцин A1, фострієцин, теніпозид, мітоксантрон, даунорубіцин, N-[2-диметиламіно)етил]акридин-4-карбоксамід (DACA), мербарон, хінакрин, еліптицини, епіподофілотоксини, етидій бромід, епірубіцин, пірарубіцин, 3'-деаміно-3'-морфоліно-13-дезоксо-10-гідроксикарміноміцин; 2'',3''-біс-пентафлуорфеноксиацетил-4',6'-етиліден-бета-D

глюкозид солі 4'-фосфат-4'-диметилепіподофілолотоксину з 2N-метил-глюкаміном (F11782; флуорований ліпофільний епіподофілоїд), адріаміцин, актиноміцин D, антрацикліни (як-то 9-аміноантрациклін), піразолоакридин (PZA), камптотецин, топотекан, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA) або його солі.

У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, 5,10-Дідеазатетрагідрофолієва кислота (DDATHF), піртрексим, ралітрексед, GW1843 [(S)-2-[5-[(1,2-дигідро-3-метил-1-оксобензо[f]хіназолін-9-іл)метил]аміно-1-оксо-2-ізоіндолініл]-глутарова кислота], їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі та сольвати. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У деяких втіленнях інгібітор BER та антираковий агент можна застосовувати до особи у комбінації. Наприклад, інгібітор BER та антираковий агент можна застосовувати до особи разом у парентеральній композиції. Альтернативно, інгібітор BER та антираковий агент можна застосовувати до особи разом у пероральній композиції, як-то твердій композиції.

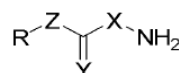
У деяких втіленнях інгібітор BER та антираковий агент можна застосовувати до особи послідовно, де особі спершу дають антираковий агент, а тоді дають інгібітор BER. Наприклад, особа може отримувати антираковий агент у парентеральній композиції, як-то внутрішньовенній композиції, або пероральній композиції, як-то твердій композиції, а тоді отримувати інгібітор BER у парентеральній композиції, як-то внутрішньовенній композиції, або пероральній композиції, як-то твердій композиції.

Альтернативно, у деяких втіленнях інгібітор BER та антираковий агент можна застосовувати до особи послідовно, де особі спершу дають інгібітор BER, а тоді дають антираковий агент. Наприклад, особа може отримувати інгібітор BER у парентеральній композиції, як-то внутрішньовенній композиції, або пероральній композиції, як-то твердій композиції, а тоді отримувати антираковий

агент у парентеральній композиції, як-то внутрішньовенній композиції, або пероральній композиції, як-то твердій композиції.

У деяких втіленнях антираковий агент та інгібітор BER можуть створювати антиракову дію більшу, ніж дія окремих агентів. Наприклад, комбінована антиракова дія антиракового агента та інгібітору BER може бути більше, ніж антиракова дія антиракового агента та інгібітору BER при застосуванні окремо.

Таким чином, сполуки є корисними як інгібітори BER, як-то метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, та сполуки, що мають структури формули I:



Формула I

де X – O або NH,

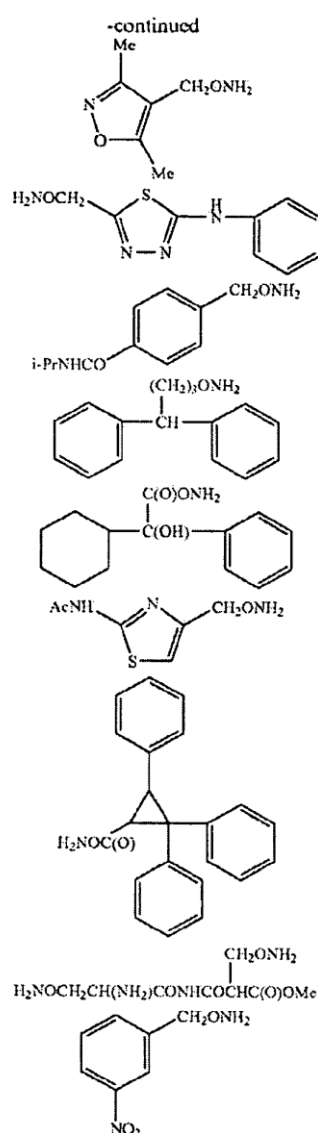
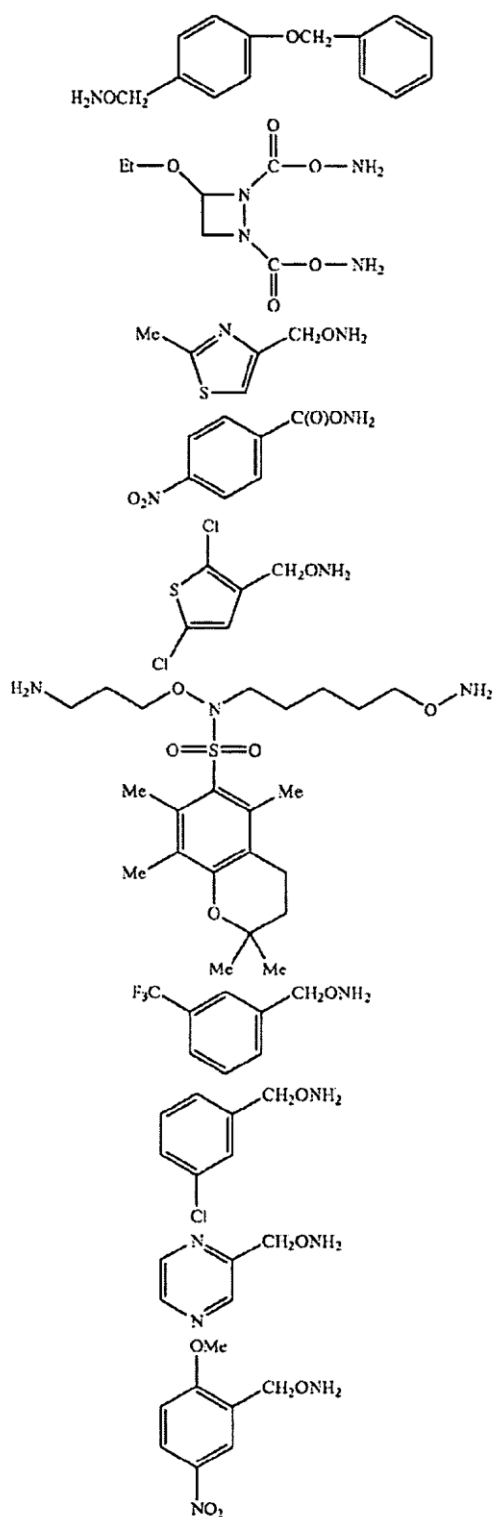
Y – O, S, або NH,

Z є відсутнім або представленим O, S, або NH, та

R – гідроген або вуглеводнева група, та їх фармацевтично прийнятні солі.

У поодиноконуклеотидному BER, фосфат-дезоксирибозу (dRP) в абазичному сайті видаляють за допомогою ліазної активності ДНК pol β. Сполуки як-то метоксіамін, реагують з альдегідом абазичного сайту, роблячи його невіддатливим до етапу β-усунення механізму dRP-ліази, тим блокуючи поодиноконуклеотидне BER.

У деяких втіленнях придатні сполуки можуть попереджувати субстрат АП-ендонуклеази від отримання сприйнятливості до розщеплення. Антиракові агенти можуть діяти зв'язуванням з АП-сайтами та попередженням АПЕ-опосередкованого розщеплення фосфодіестерних зв'язків. Інші сполуки, що можуть зв'язуватися з АП-сайти та попереджувати АПЕ-опосередковане розщеплення фосфодіестерних зв'язків, охоплюють O-бензилгідроксиамін; етил амінооксіацетат; амінооксіоцтову кислоту; етил амінооксіацетат; H₂N–OCHMeCO₂H; карбоксиметоксіамін; амінооксіоцтову кислоту; HN=C(NH₂)SCH₂CH₂ONH₂; H₂N–O(CH₂)₃SC(NH₂)=NH; MeOC(O)CH(NH₂)CH₂O–NH₂; H₂NOCH₂CH(NH₂)CO₂H; каналін; H₂N–O(CH₂)₄O–NH₂; O-(п-нітробензил)гідроксиамін; 2-аміно-4-(амінооксиметил)тіазол; 4-(амінооксиметил)тіазол; O,O'-(о-фенілендиметилен)дигідроксиамін; 2,4-динітрофеноксіамін; O,O'-(м-фенілендиметилен)дигідроксиамін; O,O'-(п-фенілендиметилен)дигідроксиамін; H₂C=CHCH₂O–NH₂; H₂N–O(CH₂)₄O–NH₂; H₃C(CH₂)₁₅O–NH₂, 2,2'-(1,2-етандііл)біс(3-аміноокси)бутендіонової кислоти диметил-діетил-естер; сполуки, що мають будь-яку з наступних структур:



та фармацевтично прийнятні солі будь-яких з цих сполук.

Сполуки, корисні як інгібітори BER, охоплюють інгібітори PARP, як-то 4-аміно-1,8-нафталімід (ANI), PD128763, 3-AB, 6-AN, та 8-гідрокси-2-метил-хіназолін-4-[3H]он (NU-1025).

Сполуки, корисні як інгібітори BER, охоплюють інгібітори ДНК-полімерази (наприклад, ДНК-полімерази β , γ або ϵ), як-то пруназин, афідиколін, 2',3'-дидезоксицитидин трифосфат (ddCTP), 2',3'-дидезокситимідин трифосфат (ddTTP), 2',3'-дидезоксиаденозин трифосфат (ddATP), 2',3'-дидезоксигуанозин трифосфат (ddGTP), 1-бета-D-арабінофуранозилцитозин (Ara-C), кофеїн, арабіноцитидин, та блеоміцин.

Сполуки, корисні як інгібітори BER, охоплюють інгібітори ДНК-лігази (наприклад, ДНК-лігази I, II, або III), як-то урсолова та олеанолова кислоти, алеуритолова кислота, протоліхестеринова кислота, свертіфранкезид, фульвоплемієрин, фагаронін хлорид, та блеоміцин. XRCC1 є білковим партнером ДНК-лігази III, а інгібітори XRCC1, як-то 3-AB, є корисними як інгібітори BER також.

Інгібітори топоізомерази II індуюють розщеплення ДНК та інші аберації хромосом, у тому числі обміни сестринських хроматид. Сполуки, корисні як інгібітори BER також охоплюють інгібітори топоізомерази II, як-то етопозид (VP-16, VP-16-123), мезо-4,4'-(2,3-бутандііл)-біс-(2,6-піперазиндіон) (ICRF-193, бісдіоксопіперазин), доксорубіцин (DOX), амсакрин (4',9-акридиніламінометансульфон-м-анізидид; mAMSA), пазеліптин, налідиксинова кислота, оксолінова кислота, новобіоцин, коумерміцин A1, фострієцин, теніпозид, мітоксантрон, даунорубіцин, N-[2-диметиламіно)етил]акридин-4-карбоксамід (DACA), мербарон, хінакрин, еліптицини, епіподофілотоксини, етидій бромід, епірубіцин, пірарубіцин, 3'-деаміно-3'-морфоліно-13-дезоксо-10-гідроксикарміноміцин; 2",3"-біс-пентафлуорфеноксіацетил-4',6'-етиліден-бета-D-глюкозид солі 4'-фосфат-4'-диметилепіподофілотоксину з 2N-метил-глюкаміном (F11782; флуорований ліпофільний епіподофілоїд), адріаміцин, актиноміцин D, антрацикліни (як-то 9-аміноантрациклін), та піразолоакридин (PZA). Інгібітори топоізомерази I, як-то камптотецин та топотекан можна також застосовувати як інгібітори BER.

У деяких втіленнях інгібітори інших ферментів, відомі у рівні техніки або ідентифіковані тут далі, а також інгібітори інших елементів провідного шляху BER, як-то ДНК-алкілтрансферазу, можна застосовувати у композиціях та способах без відходу від рамок заявлених втілень.

У деяких втіленнях заявлений винахід стосується застосування антиракового агента, як-то пеметрексед, що індукує утворення АП-сайтів та інгібітору BER (іншого, ніж інгібітор топоізомерази), як-то метоксіамін.

У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, та триметрексад. У більш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У деяких втіленнях антираковий агент можна застосовувати у дозі приблизно від 25 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла. Наприклад, доза може бути приблизно від 25 мг/м² до 200 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 150 мг/м² до 500 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 400 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 900 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 200 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; або доза може бути приблизно від 500 мг/м² до 600 мг/м² площі поверхні тіла. Антифолатні агенти є необмежувальним кращим класом антиракових агентів. У деяких втіленнях антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, та триметрексад. У більш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його

фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У деяких втіленнях співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:2 до 1:10000. Наприклад, співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:2 до 1:100; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:50 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:450 до 1:10000; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:5 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:10 до 1:50; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:15 до 1:40; або співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:20 до 1:30. У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA).

У деяких втіленнях інгібітор BER застосовують у кількості, достатній для посилення або збільшення дії антиракового агента.

У загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, 5,10-Дідеазатетрагідрофолієва кислота (DDATHF), піритрексим, ралітрексед, GW1843 [(S)-2-[5-[(1,2-дигідро-3-метил-1-оксобензо[f]хіназолін-9-іл)метил]аміно-1-оксо-2-ізоіндолініл]-глутарова кислота], їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін, етопозид (VP-16, VP-16-123), мезо-4,4'-(2,3-бутандііл)-біс-(2,6-піперазиндіон) (ICRF-193, бісдіоксопіперазин), доксорубіцин (DOX), амсакрин (4',9-акридиніламінометансульфон-м-анізидид; mAMSA), пазеліптин, налідиксинова кислота, оксолінова кислота, новобіоцин, коумерміцин A1, фострієцин, теніпозид, мітоксантрон, даунорубіцин, N-[2-диметиламіно)етил]акридин-4-карбоксамід (DACA), мербарон, хінакрин, еліптицини, епіподофілотоксини, етидій бромід, епірубіцин, пірарубіцин, 3'-деаміно-3'-морфоліно-13-дезоксо-10-гідроксикарміноміцин; 2",3"-біс-пентафлуорфеноксіацетил-4',6'-етиліден-бета-D-глюкозид солі 4'-фосфат-4'-

диметилепіподофілотоксину з 2N-метилглюкаміном (F11782; флуорований ліпофільний епіподофілоїд), адриаміцин, актиноміцин D, антрацикліни (як-то 9-аміноантрациклін), піразолоакридин (PZA), камптотецин, топотекан, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У найбільш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA) або його солі. Наприклад, інгібітором BER може бути метоксіамін гідрохлорид (MOA).

У деяких втіленнях співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:2 до 1:10000. Наприклад, співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:2 до 1:100; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:50 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:450 до 1:10000; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:5 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:10 до 1:50; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:15 до 1:40; або співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:20 до 1:30. У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA). У найбільш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA) та антираковим агентом може бути пеметрексед. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль пеметрекседу. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

Деякі втілення стосуються способу лікування раку, що полягає у забезпеченні першої композиції, що містить антираковий агент та другої композиції, що містить втіленні інгібітор BER, що можна застосовувати окремо або як комбіновану композицію;

вибір суб'єкту, у котрого діагностовано рак, де вказаний рак є резистентним до лікування антираковим агентом поодиноці або у комбінації із іншими антираковими агентами;

застосування вказаної першої композиції та вказаної другої композиції;

де кількість вказаної першої композиції та кількість вказаної другої композиції може бути у кількості, що при застосуванні до вказаного суб'єкта антиракова дія може бути більше, ніж антиракова дія першої композиції поодиноці.

У деяких втіленнях перша композиція може містити антираковий агент, вибраний з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексад, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед. У деяких втіленнях друга композиція може містити втіленні

інгібітор BER, вибраний з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін.

У деяких втіленнях антираковий агент можна застосовувати у дозі приблизно від 25 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла. Наприклад, доза може бути приблизно від 25 мг/м² до 200 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 150 мг/м² до 500 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 400 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 900 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 200 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; або доза може бути приблизно від 500 мг/м² до 600 мг/м² площі поверхні тіла. У деяких втіленнях антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексад, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, та триметрексад. У більш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У деяких втіленнях співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:2 до 1:10000. Наприклад, співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:2 до 1:100; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:50 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:450 до 1:10000; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:5 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:10 до 1:50; співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:15 до 1:40; або співвідношення інгібітору BER до антиракового агенту може бути приблизно від 1:20 до 1:30. У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилмалеїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA).

Деякі втілення стосуються способу лікування раку, що полягає у забезпеченні вибраного з групи:

перша композиція, що містить антираковий агент та друга композиція, що містить інгібітор BER, що можна застосовувати окремо або як комбіновану композицію;

вибір суб'єкту, у котрого діагностовано;

застосування вказаної першої композиції та вказаної другої композиції;

де кількість вказаної першої композиції та кількість вказаної другої композиції може бути у кількості, що при застосуванні до вказаного суб'єкта антиракова дія може бути більше, ніж сумарна антиракова дія першої композиції, що містить антираковий агент та другої композиції, що містить інгібітор BER.

У деяких втіленнях перша композиція може містити антираковий агент, вибраний з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексат, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, триметрексат, аміноптерин, їх фармацевтичні солі та будь-які комбінації. У загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед. У деяких втіленнях друга композиція може містити інгібітор BER, вибраний з групи: метоксіамін (MOA), N-етилmaleїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін.

У деяких втіленнях антираковий агент можна застосовувати у дозі приблизно від 25 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла. Наприклад, доза може бути приблизно від 25 мг/м² до 200 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 150 мг/м² до 500 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 400 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 900 мг/м² до 5000 мг/м² площі поверхні тіла; доза може бути приблизно від 200 мг/м² до 1000 мг/м² площі поверхні тіла; або доза може бути приблизно від 500 мг/м² до 600 мг/м² площі поверхні тіла. У деяких втіленнях антираковий агент можна вибрати з групи: пеметрексед, капецитабін, едатрексат, метотрексат, лометрексол, нолатрексед, ралітрексед, PT523, та триметрексат. У більш загальному втіленні антираковим агентом може бути пеметрексед та його фармацевтично прийнятні солі. Наприклад, пеметрекседом може бути динатрієва сіль. У зразковому втіленні пеметрекседом може бути динатрієва сіль гептагідрат.

У деяких втіленнях співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:2 до 1:10000. Наприклад, співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:2 до 1:100; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:50 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:450 до 1:10000; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:5 до 1:500; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:10 до 1:50; співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:15 до 1:40; або співвідношення інгібітору BER до антиракового агента може бути приблизно від 1:20 до 1:30. У загальному втіленні інгібітор BER можна вибрати з групи: метоксіамін (MOA), N-етилmaleїмід, O⁶-бензилгуанін, їх фармацевтично прийнятні солі та будь-які комбінації. У більш загальному втіленні інгібітором BER може бути метоксіамін (MOA).

Ще одним аспектом поточного втілення є неочікувана вказівка, що деякі інгібітори BER діють синергічно у комбінації з деякими антифолатними агентами і неочікувано усувають резистентність до деяких антифолатних агентів. Таким чином, у необмежувальних кращих втіленнях антиметаболітний антираковий агент є антифолатним антираковим агентом. Ці антифолатні агенти порушують залежні від фолатів метаболічні процеси, суттєві для реплікації клітин. Антифолатні агенти є відмін-

ними від інших хіміотерапевтичних агентів тим, що вони діють для порушення клітинних процесів, залучених у метаболізм фолатів, тобто інгібування залежних від фолатів ферментів, як-то, але без обмеження, тимідилат-синтаза (TS). Роз'єднання залежних від фолатів процесів призводить до невідповідної реплікації ДНК та апоптозу клітин, що швидко діляться, у тому числі клітин раку. В одному втіленні, співвідношення MOA до антиметаболітного антиракового агента є приблизно між 1:5 та 1:500. У деяких втіленнях співвідношення MOA до антиметаболітного антиракового агента є приблизно між 1:10 та приблизно 1:100, приблизно між 1:25 та приблизно 1:75, приблизно між 1:15 та приблизно 1:40, або приблизно між 1:20 та приблизно 1:30. На додаток, другий антираковий агент можна застосовувати до або після комбінації MOA та антиметаболітного антиракового агента.

Фармацевтичні Композиції

Слід усвідомлювати, що запропоновані тут композиції можуть бути у будь-якій формі, котра дає композицію для застосування до пацієнта. Наприклад, композиція може бути у твердій, рідкій або газуватій формі (наприклад, аерозоль). Інші придатні шляхи застосування охоплюють, без обмеження, пероральний, місцевий, парентеральний (наприклад, сублінгвально або букально), сублінгвальний, ректальний, вагінальний, та інтраназальний. Термін парентеральний, як застосовувано тут, охоплює підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньогрудинні, внутрішньокавернозні, інтратекальні, внутрішньоканальні, інтрауретральні ін'єкції або вливання. Фармацевтичну композицію формують так, щоб дозволити активним складовим бути біопридатними при застосуванні композиції до пацієнта. Композиції, що слід застосовувати до пацієнта, мають форму одної або більше окремих доз, де наприклад, таблетка може бути поодиноким окремою дозою, а резервуар одної або більше сполук винаходу в аерозольній формі може містити множинність окремих доз.

У ще одному аспекті це розкриття стосується фармацевтичної композиції, що містить фізіологічно прийнятні поверхнево-активні агенти, носії, розріджувачі, наповнювачі, суспендувальні агенти, плівкотвірні речовини та їх комбінацію; та сполуку, розкриту тут. Прийнятні носії або розріджувачі для терапевтичного застосування є добре відомими у рівні фармацевтичної техніки, та є описаними, наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), що уведено як посилання. Консерванти, стабілізатори, барвники, підсолоджувачі, ароматизатори, приправи, тощо можуть бути у фармацевтичній композиції. Наприклад, натрій бензоат, аскорбінову кислоту та естери п-гідроксибензойної кислоти можна додавати як консерванти. На додаток, можна застосовувати антиоксиданти та суспендувальні агенти. У різних втіленнях спирти, естери, сульфатовані аліфатичні спирти, тощо, можна застосовувати як поверхнево-активні агенти; сахарозу, глюкозу, лактозу, крохмаль, кристалічну целюлозу, манітол, магній алюмінат, магній метасиликат алюмінат, синтетичний алюмосиликат, кальцій кар-

бонат, натрій карбонат, кальцій гідрогенфосфат, кальцій-карбоксиметилцелюлозу, тощо можна застосовувати як наповнювачі; магній стеарат, тальк тощо можна застосовувати як вирівнювальні агенти; кокосову олію, оливкову олію, кунжутну олію, арахісову олію, сою можна застосовувати як суспендувальні агенти; целюлози ацетат-фталат як похідне вуглеводу як-то целюлози або цукру, або метилацетат-метакрилат кополімер як похідне полівінілу можна застосовувати як суспендувальні агенти; та пластифікатори, як-то фталати тощо можна застосовувати як суспендувальні агенти.

Термін "фармацевтична композиція" стосується суміші сполук, розкритих тут, з іншими хімічними компонентами, як-то розріджувачі або носії. Фармацевтична композиція полегшує застосування сполуки до організму. Багато способів застосування сполук існують у рівні техніки, у тому числі, але без обмеження, пероральні, ін'єкційні, аерозольні, парентеральні та місцеві. Фармацевтичні композиції можна також отримувати реакцією сполуки з неорганічними або органічними кислотами як-то хлоридна кислота, бромідна кислота, сульфатна кислота, нітратна кислота, фосфатна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, п-толуєнсульфонова кислота, саліцилова кислота тощо.

Термін "носії" визначає хімічну сполуку, що полегшує введення сполуки у клітини або тканини. Наприклад, диметилсульфоксид (ДМСО) є звичайно застосовуваним носієм, оскільки він полегшує поглинання багатьох органічних сполук у клітини або тканини організму.

Термін "розріджувач" визначає хімічні сполуки у воді, що розчиняють потрібну сполуку, а також стабілізують біологічно активну форму сполуки. Солі, розчинні у буферованих розчинах є застосовуваними як розріджувачі у рівні техніки. Одним звичайно застосовуваним буферованим розчином є буферований фосфатом фізіологічний розчин, оскільки він імітує сольові умови крові людини. Оскільки буферні солі можуть контролювати рН розчину при низьких концентраціях, буферований розріджувач рідко впливає на біологічну активність сполуки.

Термін "фізіологічно прийнятний" визначає носій або розріджувач, що не усуває біологічну активність та властивості сполуки.

Фармацевтичні композиції, описані тут, можна застосовувати до людини безпосередньо, або у фармацевтичних композиціях, де вони є змішаними з іншими активними компонентами, як у комбінаційній терапії, або придатними носіями або наповнювачами. Способи композиції та застосування сполук заявленого винаходу можна знайти у "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990.

Придатні шляхи застосування, наприклад, охоплюють пероральне, ректальне, кризьслизове, місцеве, або кишкове застосування; парентеральне постачання, у тому числі внутрішньом'язові, підшкірні, внутрішньовенні, внутрішньомозкові ін'єкції, а також інтратекальні, безпосередні інтравентрикулярні, інтраперитонеальні, інтраназальні або внутрішньоочні ін'єкції. Сполуки можна також

застосовувати у дозованих формах з безперервним чи регульованим вивільненням, у тому числі ін'єкціями депо, осмотичних насосах, пілюлях, трансдермальних (у тому числі електропереніс) пов'язках, тощо, для подовженого та/або спланованого у часі, імпульсного застосування при попередньо визначеній частоті.

Фармацевтичні композиції заявленого винаходу можна виробляти відомим чином, наприклад, засобами змішування, розчинення, гранулювання, вироблення драже, розтирання у порошок, емульгування, інкапсулювання, включення або таблетування.

Фармацевтичні композиції для застосування згідно з заявленим винаходом таким чином можна формувати у звичайному стилі, застосовуючи один або більше фізіологічно прийнятних носіїв, що охоплюють наповнювачі, котрі полегшують процесинг активних сполук у препарати, котрі можна застосовувати фармацевтично. Відповідні композиції є залежними від вибраного шляху застосування. Будь-який з добре відомих способів, носіїв, та наповнювачі можна застосовувати як придатні та як зрозуміло з рівня техніки; наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences, вище.

Придатні для застосування ін'єкції можна отримувати у звичайній формі, як рідкі розчини або суспензії, тверді форми, придатні для розчинів або суспензій у рідинах для ін'єкцій, або як емульсії. Придатними наповнювачами є, наприклад, вода, фізіологічний розчин, декстроза, манітол, лактоза, лецитин, альбумін, натрій глютамат, цистеїн гідрохлорид, тощо. На додаток, якщо потрібно, придатні для застосування ін'єкціями фармацевтичні композиції можуть містити другорядні кількості нетоксичних допоміжних речовин, як-то змочувальні агенти, рН-буферувальні агенти, тощо. Фізіологічно сумісні буфери охоплюють, але без обмеження, розчин Ханка, розчин Рингера, або буферований фізіологічний розчин. Якщо потрібно, можна застосовувати препарати підсилення поглинання (наприклад, ліпосоми).

Для кризьслизового застосування, можна застосовувати у композиції підходить для проникнення кризь бар'єр пенетранти.

Фармацевтичні композиції для парентерального застосування, наприклад, болюсною ін'єкцією або безперервним вливанням, охоплюють водні розчини активних сполук у водо-розчинній формі. Додатково, суспензії активних сполук можна отримувати як підходить олійсті суспензії для ін'єкцій. Придатні ліпофільні розчинники або носії охоплюють жирні оливи як-то кунжутна олія, або інші органічні оливи як-то оливи сої, грейпфруту або мигдалю, або синтетичні естери жирних кислот, як-то етилолеат або тригліцериди, або ліпосоми. Суспензії для водних ін'єкцій можуть містити речовини, котрі збільшують в'язкість суспензії, як-то натрій карбоксиметилцелюлоза, сорбітол, або декстран. Необов'язково, суспензія може також містити придатні стабілізатори або агенти, що збільшують розчинність сполук для отримання високонцентрованих розчинів. Композиції для ін'єкції можуть бути у формі окремої дози, наприклад, в ампулах або у багатодозових резервуарах, із до-

даним консервантом. Композиції можуть мати такі форми як суспензії, розчини або емульсії у олійних або водних носіях, та можуть містити формувальні агенти як-то суспендувальні агенти, стабілізатори та/або диспергатори. Альтернативно, активна складова може бути у формі порошку для складання з придатним носієм, наприклад, стерильною водою без пірогену перед застосуванням.

Для перорального застосування сполуки можна формувати комбінуванням активних сполук з фармацевтично прийнятними носіями, добре відомими у рівні техніки. Такі носії надають змоги сполукам винаходу формуватися у таблетки, пілюлі, драже, капсули, рідини, гелі, суспензії тощо, для перорального застосування. Фармацевтичні препарати для перорального застосування можна отримувати комбінуванням активної сполуки з твердим наповнювачем, необов'язково розмеленням утвореної суміші, та обробленням суміші гранул, після додавання придатних наповнювачів, якщо потрібно, для отримання серцевин таблеток або драже. Придатними наповнювачами є, зокрема, цукри, у тому числі лактоза, сахароза, манітол, або сорбітол; препарати целюлози як-то, наприклад, кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль, картопляний крохмаль, желатин, трагакантова камедь, метилцелюлоза, гідроксипропілметил-целюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, та/або полівінілпіролідон (PVP). Якщо потрібно, можна додавати дезінтегратори, як-то перехресно-зв'язаний полівінілпіролідон, агар, або альгінова кислота або її сіль як-то натрій альгінат. Серцевини драже є запропонованими з придатними покриттями. Для цього можна застосовувати концентровані розчини цукру, котрі можуть необов'язково містити гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, карборол-гель, поліетиленгліколь, та/або титан діоксид та придатні органічні розчинники або суміші розчинників. Барвники або пігменти можна додавати до покриття таблетки або драже для ідентифікації або для охарактеризування відмінних комбінацій дози активної сполуки. Для цього можна застосовувати концентровані розчини цукру, котрі можуть необов'язково містити гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, карборол-гель, поліетиленгліколь, та/або титан діоксид та придатні органічні розчинники або суміші розчинників. Барвники або пігменти можна додавати до покриття таблетки або драже для ідентифікації або для охарактеризування відмінних комбінацій дози активної сполуки.

Фармацевтичні препарати, котрі можна застосовувати перорально, охоплюють капсули з желатину, а також м'які капсули желатину та пластифікатору, як-то гліцерин або сорбітол. Капсули можуть містити активні складові у суміші з наповнювачем як-то лактоза, зв'язуючі як-то крохмалі, та/або лубриканти як-то тальк або магній стеарат та, необов'язково, стабілізатори. У м'яких капсулах активні сполуки можна розчиняти або суспендувати у придатних рідинах, як-то жирні оливи, рідкий парафін, або рідкі поліетиленгліколи. На додаток, можна додавати стабілізатори. Усі композиції для перорального застосування повинні бути у дозах, придатних для такого застосування.

Для букального застосування, композиції можуть мати форму таблеток або пастилок, сформованих у звичайному стилі.

Для застосування інгаляцією, сполуки для застосування згідно з заявленим винаходом зручно постачати у формі аерозолі у упаковки під тиском чи розпилювачу, із застосуванням придатного пропеленту, як-то, дихлордифлуорметан, трихлорфлуорметан, дихлортетрафлуоретан, карбон діоксид або інший придатний газ. У випадку аерозолі під тиском окрему дозу можна забезпечувати клапан для постачання вимірюваної кількості. Капсули та картриджі, наприклад, з желатину, для застосування в інгаляторі або апараті для вдихання можна формувати з вмістом порошкової суміші сполуки та придатної порошкової основи як-то лактоза або крохмаль.

Крім того розкритими тут є різні фармацевтичні композиції, добре відомі у рівні фармацевтичної техніки, що охоплюють внутрішньоочні, інтраназальні та інтрааурикулярні. Придатні для цього пенетранти є загалом відомими у рівні техніки. Фармацевтичні композиції для внутрішньоочного постачання охоплюють водні очні розчини активних сполук у водо-розчинній формі, як-то краплі для очей, або у гелановій камеді (Shedden et al., Clin. Ther., 23(3):440-50 (2001)) або гідрогелі (Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2):101-3 (1996)); очні мазі; очні суспензії з вмістом невеликих полімерних частинок ліків, що суспендовані у рідкому носії (Joshi, A., J. Ocul. Pharmacol., 10(1):29-45 (1994)), розчинні у ліпідах композиції (Alm et al., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58 (1989)), та мікросфери (Mordenti, Toxycol. Sci., 52(1):101-6 (1999)); та очні вставки. Усе з вищезгаданого уведено як посилання. Такі придатні фармацевтичні композиції є найбільш часто та переважно сформовані як стерильні, ізотонічні та буферовані для стабільності та зручності. Фармацевтичні композиції для інтраназального постачання можуть також охоплювати краплі та спреї, часто отримувані для стимуляції назальної секреції для підтримки нормальної в'язкості дії. Як розкрито у Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), що уведено як посилання, та добре відоме спеціалістам, придатні композиції є найбільш часто та переважно ізотонічними, трохи буферованими для підтримування pH 5,5 – 6,5, та найбільш часто та переважно містять антимікробні консерванти та підхожі стабілізатори ліків. Фармацевтичні композиції для інтрааурикулярного постачання охоплюють суспензії та мазі для місцевого застосування у вухах. Загальні розчинники для таких вушних композицій охоплюють гліцерин та воду.

Сполуки можна також формувати у ректальних композиціях, як-то супозиторіях чи клізмах, наприклад, що містять звичайні основи супозиторіїв як-то масло какао або інші гліцериди.

На додаток до описаних раніше композицій сполуки можна також формувати як препарат у депо. Такі довгодіючі композиції можна застосовувати імплантацією (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або внутрішньом'язовою ін'єкцією. Таким чином, наприклад, сполуки можна формувати

вати з придатними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, як емульсію у прийнятній оливі) або іонообмінними смолами, або як недостатньо розчинні похідні, наприклад, як недостатньо розчинна сіль.

Для гідрофобних сполук придатним фармацевтичним носієм може бути система співрозчинників, що містить бензиловий спирт, неполярний сурфактант, змішуваний з водою органічний полімер та водну фазу. Застосовуваною загальною системою співрозчинників є система співрозчинників VPD, котрею є розчин 3 мас./об.% бензинового спирту, 8 мас./об.% неполярного сурфактанту Polisorbate 80™, та 65 мас./об.% поліетиленгліколю 300, доводячи об'єм абсолютним етанолом. Звичайно, пропорції системи співрозчинників можна варіювати без порушення її характеристик розчинності та токсичності. Більш того, ідентичність компонентів співрозчинників можна варіювати: наприклад, інший низько-токсичний неполярний сурфактант можна застосовувати замість Polisorbate 80™; розмір фракції поліетиленгліколю можна варіювати; інші біосумісні полімери можна заміщувати поліетиленгліколем, наприклад, полівінілпіролідом; а інші цукри або полісахариди можна заміщувати декстрозою.

Альтернативно, можна застосовувати інші системи постачання для гідрофобних фармацевтичних сполук. Ліпосоми та емульсії є добре відомими прикладами постачання носіїв для гідрофобних ліків. Деякі органічні розчинники як-то диметилсульфоксид, також можна застосовувати, хоча звичайно при небезпеці більшої токсичності. Додатково, сполуки можна постачати, застосовуючи систему з безперервним вивільненням, як-то напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять терапевтичний агент. Різні матеріали для безперервного вивільнення встановлені та є добре відомими спеціалістами. Капсули для безперервного вивільнення можуть, залежно від їх хімічної природи, вивільняти сполуки протягом від кількох тижнів до 100 діб. Залежно від хімічної природи та біологічної стабільності терапевтичного реагенту можна застосовувати додаткові стратегії для стабілізації білку.

Агенти для застосування внутрішньоклітинно можна застосовувати, застосовуючи способи, добре відомі спеціалістам. Наприклад, такі агенти можуть бути інкапсульованими у ліпосоми. Усі молекули у водному розчині під час утворення ліпосом уводять у водну внутрішню частину. Вміст ліпосом є захищеним від зовнішнього мікрооточення, а оскільки ліпосоми зливаються з мембранами клітин, ефективно потрапляють у цитоплазму клітин. Ліпосому можна покривати тканино-специфічним антитілом. Ліпосоми слід селективно націлювати на потрібний орган. Альтернативно, невеликі гідрофобні органічні молекули можуть бути безпосередньо застосовуваними внутрішньоклітинно.

Додаткові терапевтичні або діагностичні агенти можна вводити у фармацевтичні композиції. Альтернативно або додатково, фармацевтичні композиції можуть бути комбінованими з іншими композиціями, що містять інші терапевтичні або діагностичні агенти.

Способи застосування

Сполуки або фармацевтичні композиції можна застосовувати до пацієнта будь-якими придатними засобами. Необмежувальні приклади способів застосування охоплюють, серед іншого, (а) застосування пероральними шляхами, котре охоплює застосування у капсулах, таблетках, гранулах, спреях, сиропах або інших таких формах; (b) застосування непероральними шляхами, як-то ректальним, вагінальним, інтрауретральним, внутрішньоочним, інтраназальним або інтрааурикулярним, що охоплює застосування водної суспензії, олійного препарату тощо, або як крапель, спрею, супозиторію, мазі тощо; (c) застосування ін'єкцією, підшкірно, інтраперитонеально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтрадермально, внутрішньоочно, внутрішньокапсулярно, інтраспінально, внутрішньогрудинно, тощо, у тому числі постачання насосом для вливання; (d) застосування локально як-то ін'єкцією безпосередньо у нирки або серце, наприклад, імплантацією депо; а також (e) застосування місцево; як зрозуміло спеціалістам з контакту сполук винаходу з живою тканиною.

Фармацевтичні композиції для застосування охоплюють композиції, де активні складові містяться у кількості, ефективній для досягнення потрібної мети. Терапевтично ефективна кількість сполуки повинна залежати від шляху застосування, типу тварини, у тому числі людини, яку лікують, та фізичних характеристик конкретної тварин. Доза може бути підігнаною для досягнення потрібної дії, але повинна залежати від таких факторів, як маса, харчування, одночасне лікування, та інших факторів, що визначають спеціалісти. Більш конкретно, терапевтично ефективна кількість означає кількість сполуки, ефективну для попередження, полегшення або поліпшення симптомів хвороби або подовження життя суб'єкта, якого лікують. Визначення терапевтично ефективної кількості є добре відомим спеціалістам, особливо у світі запропонованого тут розкриття.

Як зрозуміло спеціалісту, корисна *in vivo* доза для застосування та конкретний режим застосування змінюватимуться залежно від віку, маси та виду ссавців, яких лікують, конкретної застосовуваної сполуки, та певного застосування, для якого ці сполуки є застосовуваними. Визначення ефективних рівнів доз, необхідних для досягнення потрібного результату, може досягти спеціаліст, застосовуючи звичайні фармакологічні способи. Звичайно, клінічне застосування людиною продуктів починається при нижчих рівнях доз, зі збільшенням рівня доз до досягнення потрібної дії. Альтернативно, прийняття *in vitro* дослідження можна застосовувати для встановлення корисної дози та шляхів застосування композицій, застосовуючи встановлені фармакологічні способи.

У дослідженнях тварин застосування можливих продуктів починається при вищих рівнях доз зі зменшенням рівня доз до досягнення потрібної дії або шкідливої побічної дії. Доза може залежати від потрібної дії та терапевтичного показання. Звичайно, дози можуть бути приблизно між 10 мкг/кг та 100 мкг/кг маси тіла, переважно приблизно між 100 мкг/кг та 10 мкг/кг маси тіла. Альтернативно

доза можуть визначатися за площею поверхні пацієнта, як зрозуміло спеціалістам.

Точний склад, шлях застосування та дозу для фармацевтичної композиції заявленого винаходу може вибрати спеціаліст. (Дивись, наприклад, Fingl et al. 1975, у «The Pharmacological Basis of Therapeutics», що уведено тут як посилання, з конкретним посиланням на Ch. 1, р. 1). Звичайно, застосовувані до пацієнта межі доз композиції можуть бути приблизно від 0,5 до 1000 мг/кг маси тіла пацієнта. Доза може бути поодиноким або серіями двох або більше даних протягом одної або більше діб, як необхідно пацієнту. У випадках, де дози для сполуки встановлені для принаймні певного стану, заявлений винахід застосовуватиме ті ж дози, або дози, що є приблизно між 0,1% та 500%, краще приблизно між 25% та 250% встановленої дози для людини, де доза не для людини є встановленою, як повинно бути у випадку для нещодавно відкритих фармацевтичних сполук, придатна доза для людини може бути від значень ED_{50} або ID_{50} , або інших підхожих значень, похідних від *in vitro* або *in vivo* досліджень, як визначено у дослідженнях токсичності та дослідженнях ефективності у тварини.

Слід зауважити, що спеціаліст міг би визначити, коли припинити, перервати або пристосувати застосування внаслідок токсичності або дисфункції органу. Навпаки, спеціаліст міг би також визначити пристосування лікування до вищих рівнів, якщо клінічні реакції не були адекватними (запобіжними токсичності). Розмір застосовуваних доз у лікуванні розладу потрібно змінювати із суворістю стану, який лікують, та шляху застосування. Суворість стану можна, наприклад, оцінювати, зокрема, стандартними способами оцінки. Крім того, доза та частота доз, також змінюватимуться згідно з віком, масою тіла, та реакціями пацієнта. Програму, порівняну з обговореною вище, можна застосовувати у ветеринарії.

Хоча точну дозу слід визначати на базисі підбору доз, у більшості випадків деякі узагальнення стосовно дози зробити можна. На добу режим доз для дорослої людини може бути, наприклад, пероральною дозою між 0,1 мг/м² та 2000 мг/м² площі поверхні тіла на добу кожної активної складової, звичайно між 1 мг/м² та 500 мг/м² площі поверхні тіла на добу, наприклад, 5 мг/м² до 200 мг/м² площі поверхні тіла на добу. В інших втіленнях внутрішньовенна, підшкірна або внутрішньом'язова доза кожної активної складової є між 0,01 мг/м² та 100 мг/м² площі поверхні тіла на добу, звичайно між 0,1/м² мг та 60 мг/м² площі поверхні тіла на добу, наприклад, 1 мг/м² – 40 мг/м² площі поверхні тіла на добу. У випадку застосування фармацевтично прийнятної солі, дози можна розраховувати як вільну основу. У деяких втіленнях композицію застосовують 1 – 4 рази на добу. Альтернативно композиції винаходу можна застосовувати безперервним внутрішньовенним вливанням, переважно при дозі кожної активної складової до 1000 мг/м² площі поверхні тіла на добу. Як треба розуміти спеціалістам, у деяких ситуаціях може бути необхідним застосовувати розкриті тут сполуки у кількості, що перевищує,

вищезазначені, кращі межі доз для ефективного та енергійного лікування особливо агресивної хвороби або інфекції. У деяких втіленнях сполуки слід застосовувати протягом безперервної терапії, наприклад, протягом тижня або більше, або протягом місяців чи років.

Кількість та інтервал між дозами можна пристосовувати окремо для забезпечення рівнів у плазмі активної речовини, котрі є достатніми для підтримання модульовальної дії, або мінімальної ефективної концентрації (MEC). MEC змінюватимуться для кожної сполуки, але можуть бути оцінені за *in vitro* даними. Дози, необхідні для досягнення MEC, повинні залежати від характеристик особи та шляху застосування. Однак, ВЕРХ-аналізи або біоаналізи можна застосовувати для визначення концентрації у плазмі.

Інтервали між дозами можна також визначати, застосовуючи значення MEC. Композиції слід застосовувати, застосовуючи режим, котрий підтримує рівні у плазмі вище MEC протягом 10-90% часу, звичайно між 30-90% та найбільш звичайно між 50-90%.

У випадках локального застосування або селективного поглинання, ефективна локальна концентрація ліків може не бути зв'язаною з концентрацією у плазмі.

Кількість застосовуваної композиції може бути залежно від суб'єкта, якого лікують, маси суб'єкта, суворості хвороби, способу застосування та висновку спеціаліста.

Сполуки, розкриті тут, можна оцінювати на ефективність та токсичність, застосовуючи відомі способи. Наприклад, токсичність конкретної сполуки може бути встановленою визначенням *in vitro* токсичності проти лінії клітин, як-то ссавців, а переважно людини. Результати таких досліджень часто прогнозують токсичність у тварин, як-то ссавців, або більш конкретно, людей. Альтернативно, токсичність конкретних сполук у тваринній моделі, як-то у мишей, щурів, кролів, або мавп, можна визначати, застосовуючи відомі способи. Ефективність конкретної сполуки можна встановити, застосовуючи кілька способів визначення, як-то *in vitro* способи, тваринні моделі, або клінічні дослідження людини. Визначені *in vitro* моделі існують для майже кожного класу стану, у тому числі, але без обмеження, раку, серцево-судинних хвороб, та різних імунних дисфункцій. Подібно, прийнятні тваринні моделі можна застосовувати для встановлення ефективності хімікатів для лікування таких станів. При виборі моделі для визначення ефективності спеціаліст може вибрати підходящу модель, дозу та шлях застосування і режим. Безумовно, клінічні дослідження людини можна застосовувати також для визначення ефективності сполуки у людей.

Композиції можуть, якщо потрібно, бути в упаковці або розподільному пристрої, що можуть містити одну або більше окремих доз, що містять активну складову. Упаковка може, наприклад, містити металеву або пластикову фольгу, як-то блістерну упаковку. Упаковка або розподільний пристрій можуть мати інструкції для застосування. Упаковка або розподільний пристрій можуть мати

також попередження на резервуарі стосовно вивільнення або застосування фармацевтичних агентів, ці попередження стосуються дозволу форми ліків для застосування людиною або ветеринарного застосування. Це, наприклад, може бути допущеним Управлінням по санітарному нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів для ліків. Композиції, що містять сполуку винаходу, сформовані з фармацевтичним носієм можна також отримувати, розміщати у підходящому резервуарі та рекомендувати для лікування визначеного стану.

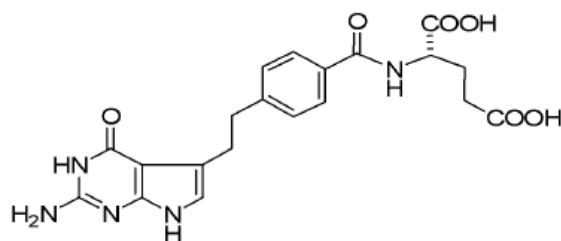
На першому етапі BER, серії глікозилаз визначають аномальні основи як-то N^3 mA та N^7 mG (O'Connor et al. "Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylase" EMBO J. 9:3337-3342, 1990; Samson et al. "Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9127-9131, 1991), T:G mismatch (Neddermann et al. "Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130" J. Biol. Chem. 271:12767-12774, 1996), та деаміновані основи як-то гіпоксантин/окиснен 8-оксо-7,8-дигідрогуанін або урацил :A (Vollberg et al. "Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8693-8697, 1989; Olsen et al. "Molecular cloning of людини урацил-ДНК глікозилаз, високо консервован фермент відновлення ДНК" EMBO J. 8:3121-3125, 1989; Radicella et al. "Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8010-8015, 1997; Rosenquist et al. "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7429-7434, 1997, 1997). Після ферментативного або спонтанного гідролізу N-глікозидного зв'язку та вивільнення аномальної основи, АП (апуринова/апіримідинова) ендонуклеаза гідролізує фосфодіестерний скелет 5' до ураження та dRpаза (ДНК-дезоксирибосфосфодіестераза та її активність є асоційованими з полімеразою β) видаляє залишкову dRp, створенням одонуклеотидного гелу. ДНК-полімераза β заповнює гел, а ДНК-лігаза ізолює нік. Цей провідний шлях названо коротко-сполучене BER. Альтернативний провідний шлях для BER залучає синтез ДНК для заповнення ге застосування з 2 – 13 нуклеотидів. Це довго-сполучене відновлення потребує проліферування клітинного ядерного антигену (PCNA) та PCNA-залежної ДНК-полімерази (Wilson "Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta" Mutation Res. 407:203-215, 1998).

Полі-(ADP-рибоз)-полімераза (PARP) діє як нік-сенсор розривів ланцюга ДНК самостійно чи взаємодією з XRCC1 та є залученою у BER. PARP зв'язує пошкоджену ДНК, утворену в авторибозилуванні. Модифікований білок тоді вивільняється та дозволяє іншим білкам доступ та відновлення розривів ланцюга ДНК (Wilson "Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta" Mutation

Res. 407:203-215, 1998; Molinete et al. "Over production of the poly (ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells" EMBO J. 12:2109-2117, 1993; Caldecott et al. "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro" Nucleic Acids Res. 24:4387-4394, 1996). Тому, PARP приймає участь у BER після утворення ніку у коротко-сполученому та довго-сполученому відновленні. Це виявляє найактивніший у альтернативному (довго-сполученому відновленні) провідний шлях для BER. Фіг. 6 показує: комбінація пеметрекседу та MOA підсилює утворення розщепленого PARP. Підсилення розривів подвійного ланцюга ДНК та апоптоз є незалежними від провідного шляху Bcl-2.

Загалом, застосовувана далі номенклатура та лабораторні процедури у культурі клітин, культурі тканин, біології пухлин, та молекулярній генетиці, описані нижче, є добре відомими та звичайно застосовуваними у рівні техніки. Стандартні способи є застосовуваними для культур клітин, експериментів та композиції сполук та номенклатури. Загалом хімічні реакції та етапи очистки виконують згідно з описом виробника. Способи загалом виконують звичайними способами у рівні техніки (дивись, загалом, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., та Current Protocols у Molecular Biology (1996) John Wiley та Sons, Inc., N.Y., котрі є уведеними як посилання), котрі є запропонованими у цьому документі. Усю інформацію уведено як посилання.

Пеметрексед (2-[4-[2-(4-аміно-2-оксо-3,5,7-триазабіцикло[4,3,0]нона-3,8,10-тієн-9-іл)етил]бензоїл]амінопентандіонова кислота) (ALIMTA™; Eli Lilly & Co.) є антиметаболітним хіміотерапевтичним агентом, що має наступну структуру:



Пеметрексед є антифолатним антинеопластичним агентом, що викликає свою дію порушенням залежних від фолатів механізмів, необхідних для реплікації клітин. Пеметрексед інгібує тимідилатсинтазу (TS), дигідрофолат-редуктазу (DHFR) та гліцинамід-рибонуклеотид-формілтрансферазу (GARFT), ферменти приймають участь у біосинтезі нуклеотидів тимідину та пурину. Пеметрексед є затвердженим Управлінням по контролю продуктів та медикаментів для лікування раку немалих клітин легень та затвердженим у комбінації з цисплатином (хіміотерапевтичні ліки на базі платини) для лікування злоякісних плевральних мезотеліом. Рекомендована доза для лікування мезотеліом (у

комбінації з цисплатиною) або раку немалих клітин легень є приблизно 500 мг/м² площі поверхні тіла на добу, застосовуваною внутрішньовенним впливанням протягом 10 хвилин на добу 1 кожного 21-добового циклу. Для застосування у комбінаційній терапії з метоксіаміном, звичайні межі доз пеметрекседу є загалом між 200 мг/м² та 1000 мг/м² площі поверхні тіла на добу, або між 500 мг/м² та 600 мг/м² площі поверхні тіла на добу; та звичайні межі дози метоксіаміну є між 1 та 200 мг/м² площі поверхні тіла на добу, або 6 – 120 мг/м² площі поверхні тіла на добу. В одному втіленні, пеметрексед застосовують у тому ж стилі, як описано вище; однак, внутрішньовенне впливання можна виконувати протягом 15 хвил, 20 хвил, 30 хвил, 45 хвил, 60 хвил або довше, та можна виконувати на добу 1, плюс одна або більше додаткових діб даного циклу, що може бути 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, один місяць або довше.

Приклади

Матеріали та Способи

Хімікати та реагенти. Метоксіамін (MOA) отримували від Sigma (ST. Louis, Mo.). MOA розчиняли у стерилізованій воді (pH 7,0).

Вестерн-блотування для визначення розщеплення PARP. Екстракти клітин відокремлювали за допомогою SDS-PAGE (12% поліакриламід) в апаратурі Bio-Rad minigel при 150 V протягом 1 години. Білки переносили на мембрани PVDF, застосовуючи прилад Bio-Rad mini Trans-Blot протягом 1 години при 100 V. Блотовані мембрани були блокованими 5% сухого молока у буфері TBS та тоді зондували протягом 2 годин антитілом анти-PARP C2-10 (Trevigen, Gaithersburg, Md.). Через три 5-хвилинні промивки TBS-Tween20 (0,05%), блоти інкубували з вторинним антитілом, анти-мишачим HRP-проти IgG протягом 1 години (Amersham Life Science, Arlington Height Ill.). Зв'язування антитіл візуалізували за допомогою ECL згідно з інструкціями виробника (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill.).

Пухлини у безтимусних мишей.

Клітини пухлин (5×10⁶) ін'єктували у боки самців безтимусних мишей HSD, 6-8 тижнів віку. Тварини отримували 5 інтраперитонеальних ін'єкцій на добу фізіологічного розчину, пеметрекседу поодиноці (150 мг/кг), MOA поодиноці (4 мг/кг), або комбінації пеметрекседу (150 мг/кг) та MOA (4 мг/кг) зі співвідношенням пеметрекседу до MOA 26,7:1,0. Пухлини вимірювали, застосовуючи формулу Національного інституту раку: $V = L(mm) \times l^2(mm)/2$, де L – найбільший діаметр, а l – найменший діаметр пухлини. Коли досягнуто об'єм вузлуватих потовщень приблизно 100-150 мм³, мишей з пухлинами випадково розподіляли для груп контролю або лікування (6-9 мишей/групу).

Приклад 1

Фіг. 8 показує: усі групи, що отримували Метоксіамін (MOA) + пеметрексед виявляли більшу затримку розвитку пухлин порівняно з групами, що отримували тільки пеметрексед у моделі лінії клітин людини NCI-H460 NSCLC, моделі лінії клітин A549 NSCLC, моделі лінії клітин раку товстої кишки HCT116 та моделі лінії клітин раку молочної залози MDA-MB-468. MOA усував резистентність

лінії клітин NCI-H460 NSCLC та лінії клітин раку товстої кишки HCT116 до хіміотерапії пеметрекседом.

Приклад 2

Для визначення дії пеметрекседу + метоксіаміну (MOA) порівняно з пеметрекседом поодиноці на ряді створених АП-сайтів, альдегід-реактивний зондувальний реагент (ARP) було застосовано для виміру АП-сайтів, утворених пеметрекседом та блокованих MOA. ARP та MOA мають подібну реактивність з АП-сайтами та реагують специфічно з альдегідною групою, формою АП-сайтів з відкритим кільцем. Аналіз є описаним Liu et al. (Molecular Cancer Therapeutics 2:1061-1066, 2003), та виконаним по суті, як описано Nakamura et al. (Cancer Res. 58:222-225, 1998). Клітини H460 обробляли пеметрекседом (0, 100, 200 або 400 мкМ) протягом 24 годин. ДНК (15 мкг) тоді екстрагували з клітин та інкубували з 1 мМ ARP при 37°C протягом 10 хвил. ДНК осаджували та промивали етанолом, тоді ресуспендували у буфері TE (10 мМ Трис-HCl, pH 7,2, 1 мМ EDTA) та денатурували при 100 °C протягом 5 хвил. ДНК тоді швидко охолоджували на льоді та змішували з рівною кількістю амоній ацетату (2 M). Одинок-ланцюгову ДНК тоді іммобілізували на нітроцелюлозній мембрані, застосовуючи вакуумний фільтр. Мембран інкубували кон'югованою з пероксидазою хрому при кімнатній температурі протягом 30 хвил та промивали промивальним буфером (20 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, 0,26 M NaCl, 1% Tween-20). ARP-АП-сайти візуалізували реагентами ECL (Amersham, Piscataway, NJ). Результати є показаними у Фіг. 4А. Пеметрексед у дозах 100, 200 та 400 мкМ індукував утворення АП-сайтів, зі ступенем індукування АП-сайтів, пропорційним дозі пеметрекседу (Фіг. 4А). Додавання MOA до пеметрекседу значно зменшувало число виявлюваних АП-сайтів порівняно з пеметрекседом поодиноці. Дія комбінації 200 мкМ пеметрекседу та 6 мМ MOA розглядали при 24 годин, 48 годин та 72 годин. Результати є показаними у Фіг. 4В. Протягом часу число виявлюваних АП-сайтів було зменшеним з пеметрекседом поодиноці та пеметрекседом у комбінації з MOA.

Взагалі, пеметрексед індукує утворення АП-сайтів, тоді як комбінація пеметрекседу та 100 мкМ MOA зменшує виявлювані АП-сайти до контрольних рівнів, що відповідає не відсутності АП-сайтів, але займанню АП-сайтів MOA, роблячи їх непридатними для ARP. Займання АП-сайтів є залежним від часу, вказуючи, що безперервні рівні MOA є необхідними для максимальної дії.

Приклад 3

Аналіз розривів ланцюга ДНК виконували для визначення здатності пеметрекседу та метоксіаміну (MOA) стосовно збільшення загибелі клітин пухлин опосередкованої апоптозом та розривом ланцюга ДНК. Коментний аналіз є описаним у Liu et al. (вище), та базується на здатності денатурованих, розщеплених фрагментів ДНК мігрувати назовні клітини під впливом електричного поля. Непошкоджена ДНК мігрує повільніше та залишається у межах ядер, коли застосовують струм. Пошкодження ДНК аналізували у клітині на основі оцінки форми "кометного" хвоста ДНК та відстані мігру-

вання (Helma et al., *Mutat. Res.* 466:9-15, 2000). Клітини збирали та промивали БФФР після піддавання дії 200 мкМ пеметрекседу, 6 мМ MOA, або 200 мкМ пеметрекседу + 6 мМ MOA, кожного разу протягом 4 годин. Суспензію клітин H460 (1×10^5 /мл холодного БФФР) було змішано з 1% агарозою з низькою температурою загуснення при 42°C при співвідношенні 1:10 (за об'ємом) та 75 мкл негайно переносили піпеткою на CometSlide (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD). Коли агароза з низькою температурою загуснення застигла, слайди занурювали у попередньо охолоджений лізисний буфер (10 мМ Трис-HCl, pH 10,5-11,5, 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, що містить 1% Triton X-100, додавали безпосередньо перед застосуванням) при 4 °C протягом 1 години. Після лізису слайди промивали дистильованою водою, розташовували у довжину у чані для електрофорезу та занурювали у лужний буфер (50 мМ NaOH, pH 12-12,5, 1 мМ EDTA) на 30 хвил. Слайди електрофорезували у лужному (pH>13, 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA) та нейтральному розчині (1 X TBE) протягом 25 хвил при 18 В (0,6 В/см), 250 мА. Лужний електрофорез визначає поодинокі та розриви подвійного ланцюга ДНК, утворені від AP-сайтів, а також інші лужні лабільні адукти ДНК, тоді як нейтральний електрофорез визначає домінуючі розриви подвійного ланцюга ДНК. Слайди видаляли та промивали нейтралізаційним буфером (0,5 М Трис- HCl, pH 7,5) протягом 10 хвил, тоді БФФР залишали сохнути на повітрі протягом ночі при кімнатній температурі. ДНК фарбували, застосовуючи комплект проявлення сріблом (Trevigen), за інструкціями виробника. Комети візуалізували, застосовуючи мікроскоп Olympus. Зображення збирали, застосовуючи цифрову камер та аналізували, застосовуючи програму зображення NIH.

Зображення комет показані на Фіг. 1A (лужний аналіз) та Фіг. 1B (нейтральний аналіз). Після лікування пеметрекседом та MOA, спостерігали відмінні комети, та довжина хвоста була приблизно у 4 рази більше, ніж з MOA поодиноці, та приблизно у два рази більше, ніж з пеметрекседом поодиноці (Фіг. Фіг. 1C-D).

Результати з дослідження ефективності ксенотрансплантату, аналізу AP-сайтів та аналізу комет показують, що MOA діє як структурний модулятор AP-сайтів, підсилюючи терапевтичну дію антиметаболітного агенту пеметрекседу реверсуванням резистентності до хіміотерапії, створюючи тим синергічну дію.

Приклад 4

Аналіз дії AP-сайту або MOA-AP-сайту на опосередковане ДНК-топоізомеразою II розщеплення ДНК. Позиція-специфічний апуриновий сайт вводили заміщенням поодиноким нуклеозидом дезоксиуридином на сайт розщеплення топоізомеразою II та тоді видаляли основу урацилу урацил-ДНК-глікозилазою, створенням AP-сайтів, що далі інкубують з MOA для продукування MOA-AP-сайтів (Фіг. 5A).

По-перше, було визначено, чи АПЕ має диференційну дію між регулярними AP-сайтами та MOA-AP-сайтами, розташованими у позиції специфічного сайту для розщеплення топоізомеразою

II. Результати показують, що АПЕ є здатною до розщеплення регулярних AP-сайтів краще, ніж зв'язані з MOA AP-сайти (Фіг. 5B), однак, AP та MOA-AP-сайти розщеплюються топоізомеразою II, вказуючи, що MOA-AP-сайти є здатними стимулювати опосередковане ДНК-топоізомеразою II розщеплення ДНК.

Приклад 5

Дослідження пероральної та внутрішньовенної біопридатності MOA поодиноким болюсним застосуванням до щурів Sprague Dawley (Non-GLP)

Дослідження, описані нижче, виконували для оцінки біопридатності метоксіаміну (MOA) при безпечному рівні доз порівнянням фармакокінетичних параметрів після поодиноким болюсним перорального та внутрішньовенного застосування MOA

Тест-тварини. 30 самців та 30 самиць щурів Sprague Dawley по 250- 350 г, 7-10 тижнів віку, були застосовуваними протягом дослідження.

Отримання та концентрація доз. Одну дозу розчину отримували на ту ж добу застосування дози для досягнення концентрації 4,00 мг/мл "активного" MOA, 816,77 мг MOA розчиняли у 5% декстрозі у 200-мл мірній колбі. Отриманий розчин порівну ділили на дві жовті пляшки для перорального або внутрішньовенного застосування. Аліквоти відбирали для аналізу при отриманні та після дозування переносили на сухий лід та зберігали при < -70 °C.

Застосування доз. Усіх тварин зважували на добу застосування дози. Дози були на основі маси тіла. Було застосовано постійний об'єм доз 5 мл/кг. Внутрішньовенні дози застосовували поодиноким болюсною ін'єкцією у вену хвоста, застосовуючи шприц на 3-мл з голкою 26G \times 1". Внутрішньовенну дозу застосовували при швидкості приблизно 2 мл/хвил. Пероральні дози застосовували як поодиноким болюс з голкою 18G \times 2", приєднаною до шприца 3-мл.

Збирання зразків крові. Зразки крові збирали через 5, 15, 30 хвилин, та 1, 2, 4, 6, 8, 12 та 24 годин після дози зі збиранням у два моменти часу для кожної тварини. Зразки крові збирали через шийну вену протягом попереднього моменту часу та через абдомінальну вену при вбиванні в останній момент часу. Кров переносили шприцом у тубу на 2 мл для збирання крові, що містить K₃-EDTA як антикоагулянт та інвертували до суміші. Збирання крові з абдомінальної вени виконували негайно після евтаназії CO₂.

Отримання зразків плазми та умови зберігання. Тубу з кров'ю поміщали на вологий лід перед центрифугуванням для отримання плазми. Цілі зразки крові центрифугували при 3000 об/хвил при 4 °C, протягом 10 хвил. Плазму переносили піпеткою у туби та спочатку поміщали на сухий лід та зберігали при <-70 °C.

Мас-спектрометрія (МС). Мас-спектрометричні визначення виконували за допомогою іонізації електророзпиленням з позитивним турборозпиленням, згідно із нижченаведеним описом.

МС-прилад: Applied Biosystems 3000

ВЕРХ-прилад: Agilent 1100 Series Binary Pump

Автоматичний збирач зразків: LEAP Technologies CTC-PAL

Іонізація електророзпиленням (IEP) Умови:

Температура: 500 °C
 Газ: азот
 Напруга розпилення іонів (IP): 5000
 Можливий вихід (EP): 10
 NEB: 12
 Монітор:
 Аналіт: 207,0/149,3 та 207,0/178,4 аом
 IS (аценокумерол): 354,2/296,0 та 354,2/163,1 аом

аом
 ВЕРХ-умови (на Agilent 1100):
 Мобільна фаза А: 0,1% мурашина кислота у воді
 Мобільна фаза В: 0,1% мурашина кислота в ацетонітрилі
 Колонка: Thermo Aquasil C18, 50 × 3 мм
 Захисна колонка: Thermo Aquasil C18, 10 × 4 мм

Швидкість потоку: 1,0 мл/хвил
 Об'єм ін'єкції: 50 мкл
 Градієнт:
 Час (хвил) %В
 0,0 0%
 2,0 10%
 2,2 90%
 4,5 90%
 4,6 0%
 5,6 0%

Зразок плазми для аналізу РХ-МС/МС. Зразки плазми розморожували при температурі доквілля та 250 мкл аліквотували для аналізу, якщо розбавлення не було необхідним. Зразки, відібрані при 5 хвил - 1 годині від внутрішньовенно дозованих тварин або 15 хвил - 8 годинах від перорально дозованих тварин, потребували 5- - 40-кратного розбавлення для попадання у лінійні межі способу (1 до 1000 нг/мл). Для зразків, що потребують розбавлення, підхожий об'єм відбирали та змішували з чистою плазмою щурів, що містить той же антикоагулянт, до загального об'єму 250 мкл. Результати визначення коригували з фактором розбавлення. Плазму отримували для аналізу РХ-МС/МС таким чином:

- Аліквоти плазми струшували протягом 30 с та центрифугували при 14000 об/хвил протягом 10 хвил для осадження взаємодіючих частинок.
- Аліквоту по 100 мкл відбирали від супернатанту та поміщали у 1,5 мл мікроцентрифугувальну тубу.
- До аліквоти плазми 100 мкл, 310 мкл суміші H₂O: мурашина кислота (2:1), (10 мкг/мл) та 100 мкл діетиламінобензальдегіду у розчині 2:1 H₂O: мурашина кислота (10 мкг/мл) додавали 30 мкл аценокумеролу (IS) у H₂O та добре змішували.
- Суміш тоді інкубували у водяній бані при 80 °C протягом 2 годин. Після інкубування, супернатант переносили у склянку ВЕРХ для визначення РХ-МС/МС.

Аналіз фармакокінетики та біопридатності метоксіаміну.

Аналіз фармакокінетики. (МОА) Фармакокінетичні (РК) профілі та пероральну біопридатність метоксіаміну було визначено у самців та самиць щурів Sprague Dawley після поодинокого болюсного дозування МОА внутрішньовенним та пероральним застосуванням при 20 мг/кг маси тіла. 30 щурів (15 самців та 15 самиць) для кожного шляху дозування були застосовуваними у фармакокінетичному аналізі. Зразки плазми для фармакокінетики МОА для охарактеризування отримували через 5, 15, 30 хвилин та 1, 2, 4, 6, 8, 12 та 24 годин після попередньої дози. Для підтримання нормального стану здоров'я кожний із щурів мав максимум два відбори крові у попередньо визначений момент часу для створення плазми. Показові концентрації МОА отримували усередненням значень від трьох щурів для кожного моменту часу при тих же статі та шляху дозування. Для середньої кількості доз, середніх фактичних часів збору зразків отримували відповідно від трьох щурів для кожного номінального моменту часу при тих же статі та шляху дозування. Середні концентрації МОА у плазмі, середня кількість доз, та середній фактичний час збору зразків були застосовуваними для фармакокінетичного аналізу для кожного шляху дозування.

Криві середні концентрації МОА у плазмі проти середнього часу збору зразків створювали для кожних статі та шляху дозування, застосовуючи Microsoft Excel 2000-SR1™ (Фіг.Фіг. 2-3). Концентрації МОА у плазмі – нижчі кількісно вимірювані або невиявлені обмеження (BQL), якщо представлені як 0,00 нг/мл для фармакокінетичного моделювання.

Аналіз фармакокінетичних параметрів виконували, застосовуючи некомпартментальне моделювання за допомогою WinNonlin 5,1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Фармакокінетичні параметри охоплювали максимальні концентрації у плазмі (C_{max}), час максимальної концентрації у плазмі (T_{max}), період напіввиведення (t_{1/2}), площу під кривою концентрація у плазмі - час від часу 0 до останньої вимірної концентрації у плазмі (AUC_{ост}) та площу під кривою концентрація у плазмі - час від часу 0, екстрапольованої до безконечності (AUC_{0-∞}). Для порівняння, AUC_{0-∞} було нормалізовано до номінальної загальної кількості доз МОА по 5 мг (AUC_{0-∞5}).

Аналіз біопридатності. Абсолютну пероральну біопридатність було визначено співвідношеннями пероральної AUC_{0-∞} до внутрішньовенної для метоксіаміну (МОА) (нормалізовано до загальної кількості доз 5 мг МОА) за допомогою Microsoft Excel 2000-SR1™, застосовуючи нижченаведене рівняння (МОА=TRC102):

Абсолютна біопридатність TRC102 (%) =	$\frac{(BB\text{-}доза) \cdot (ПО\ AUC_{0-\infty})}{(ПО\text{-}доза) \cdot (BB\ AUC_{0-\infty})}$	× 100
---------------------------------------	---	-------

Фактичні рівні доз МОА були 20,1 мг/кг, 20,1 мг/кг для самців та самиць щурів у групі ВВ-дозування, та 19,9 мг/кг, 20,0 мг/кг для самців та самиць щурів у групі ПО дозування, відповідно.

Фармакокінетика та біопридатність. Фармакокінетичні параметри метоксіаміну (МОА) для самців та самиць щурів Sprague Dawley, після пооди-

ногого болюсного дозування МОА внутрішньовенним та пероральним застосуванням при 20 мг/кг

маси тіла, представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Фармакокінетичні параметри МОА у плазмі від самців та самиць щурів Sprague Dawley після поодинокого болюсного дозування МОА внутрішньовенним та пероральним застосуванням Застосування при 20 мг/кг маси тіла

	Самці		Самиці	
	IV	Перорально	IV	Перорально
Середня загальна доза				
Кількість МОА (мг)	5,63	5,56	4,73	4,61
C_{\max} (нг/мл)	15510	2205	10965	2959
T_{\max} (годин)	0,08	1,0	0,08	0,50
$t_{1/2}$ (годин)	5,2	4,2	4,6	5,7
$AUC_{\text{ост}}$ (нг/мл*годин)	12518	13596	12971	11643
$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*годин)	12706	13811	13142	12029
AUC_{0-5} (нг/мл*годин) ^a	11284	12420	13892	13047
Біопридатність (%)	110		94	
F	1,1		0,94	

^a AUC_{0-5} (нг/мл*годин) отримують нормалізуванням $AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*годин) до загальної дози 5 мг МОА.

Для самців щурів кількісно вимірювали концентрації МОА у плазмі протягом 24-годинного збору зразків для внутрішньовенного та перорального застосування. Візуальний контроль кривої внутрішньовенні середні концентрації МОА у плазмі - середній час для самців свідчить про швидку фазу розподілу, котрий був повним приблизно через 2 години після дози. Внутрішньовенним шляхом C_{\max} була 15,510 нг/мл негайно після завершення болюсного застосування. Системне піддавання дії МОА, як показано $AUC_{\text{ост}}$ та $AUC_{0-\infty}$, було 12,518 нг/мл*годин та 12,706 нг/мл*годин відповідно. Внутрішньовенна $AUC_{0-\infty}$, пристосована до загальної кількості номінальної дози 5 мг (AUC_{0-5}) була 11,284 нг/мл*годин.

Для самців щурів у пероральному шляху дозування, поглинання МОА було швидким з T_{\max} 1,0 годин. C_{\max} 2,205 нг/мл була значно меншою, ніж при внутрішньовенному шляху дозування. Системне піддавання дії МОА, як показано пероральною $AUC_{\text{ост}}$, а $AUC_{0-\infty}$, була 13,596 нг/мл*годин та 13,811 нг/мл*годин відповідно. Пероральна $AUC_{0-\infty}$, пристосована до загальної кількості номінальної дози 5 мг (AUC_{0-5}) була 12,420 нг/мл*годин. Періоди напіввиведення були короткими та подібними між двома шляхами дозування (внутрішньовенно: 5,2 години, перорально: 4,2 години). Розрахована абсолютна біопридатність при пероральному застосуванні у самців щурів Sprague Dawley була 110 процентів.

Для самиць щурів, кількісно вимірювали концентрації МОА у плазмі, протягом 24-годинного збору зразків, для внутрішньовенного та перорального дозування. Візуальний контроль кривої внутрішньовенні середні концентрації МОА у плазмі - середній час для самиць свідчить про швидку фазу розподілу, котрий подібний типу самців щурів є повним приблизно через 2 години після дози. Внутрішньовенним шляхом C_{\max} була 10,965 нг/мл негайно після завершення болюсного застосування.

Системне піддавання дії МОА, як показано $AUC_{\text{ост}}$ та $AUC_{0-\infty}$, було 12,971 нг/мл*годин та 13,142 нг/мл*годин, відповідно. Внутрішньовенна $AUC_{0-\infty}$, пристосована до загальної кількості номінальної дози 5 мг (AUC_{0-5}) була 13,892 нг/мл*годин.

Для самиць щурів у пероральному шляху дозування МОА, поглинання МОА було швидким з T_{\max} 0,5 годин. C_{\max} 2959 нг/мл була значно меншою, ніж при внутрішньовенному шляху дозування, подібною до самців щурів у пероральному шляху дозування. Системне піддавання дії МОА, як показано пероральною $AUC_{\text{ост}}$, а $AUC_{0-\infty}$, була 11,643 нг/мл*годин та 12,029 нг/мл*годин відповідно. Пероральна $AUC_{0-\infty}$, пристосована до загальної кількості номінальної дози 5 мг (AUC_{0-5}) була 13,047 нг/мл*годин. Періоди напіввиведення були швидкими, подібно двом шляхам внутрішньовенного дозування (Внутрішньовенне: 4,6 годин, Пероральне: 5,7 годин), та порівняним до самців щурів. Розрахована абсолютна біопридатність у самиць щурів Sprague Dawley була 94 процент.

Щури, дозовані 20 мг/кг маси тіла (BW) внутрішньовенно або перорально не показували клінічних ознак токсичності.

У самців та самиць щурів Sprague Dawley, МОА, застосований при 20 мг/кг поодиноким болюсним пероральним застосуванням, швидко (T_{\max} 0,5 - 1,0 годин) та повністю поглинається з системною абсолютною біопридатністю приблизно 100 процентів. Хоча пероральна C_{\max} МОА є значно меншою, ніж внутрішньовенна C_{\max} , системне піддавання дії МОА, як показано $AUC_{\text{ост}}$ та $AUC_{0-\infty}$, виявляється подібним між двома шляхами дозування. Більш того, рівні у сироватці, що перевищують цільову C_{\max} , асоційовану з активністю у моделі миші раку людини (50 нг/мл) після перорального дозування у моменти часу, що можуть дозволити застосування поодинокого або двічі на добу перорального дозування.

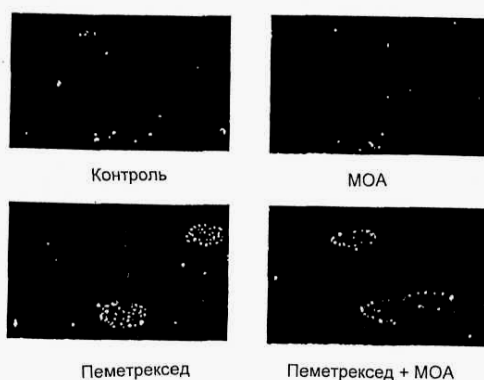
Ці дані є значущими тим, що вони показують, що метоксіамін є повністю перорально біопридатним та має період напівперетворення 4-6 годин, що дозволяє досягти мінімально ефективної концентрації при поодинокому або двічі на добу дозуванні. Обидва ці визначення є неочікуваними. Більшість антиракових агентів не є перорально біопридатними у достатніх кількостях для дозволу перорального дозування. Слід зауважити, що намагання застосовувати інші конкретні антиракові ліки перорально призвели до набагато нижчої біопридатності, ніж досягнуто тут. Дивись наприклад, блеоміцин, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, паклітаксел, ралтитрексед (антифолатний агент), топотекан, вінбластин, вінкрисин, вінорелбін усі з котрих мають менше, ніж 50% біопридатності (Chu E and DeVita VT. Physicians' Cancer Chemotherapy Drug manual 2002. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2002) По-друге, продемонстрований період напівперетворення є довшим, ніж очікуваний для невеликих молекул з молекулярною масою < 100 Да, що легко реагують з альдегідом, що може бути у плазмі, та довшим, ніж очікуваний період напівперетворення у плазмі дозволяє без-

перервні рівні ліків (вище мінімальної ефективної концентрації) з поодиноким або двічі на добу пероральним дозуванням. Повна придатність та період напівперетворення 4 - 6 годин, може дозволити пероральне дозування, застосовуючи поодиноким або двічі на добу дозування, що може бути зручним для пацієнтів.

З вищенаведеного спеціалістам треба розуміти, що різні модифікації у вищеописаних способах та композиціях можна зробити без відходу від рамок винаходу. Відповідно, винахід може бути втіленим в інших певних формах без відходу від його суттєвих характеристик. Заявлені втілення та приклади, тому, є ілюстрацією, а не обмеженням.

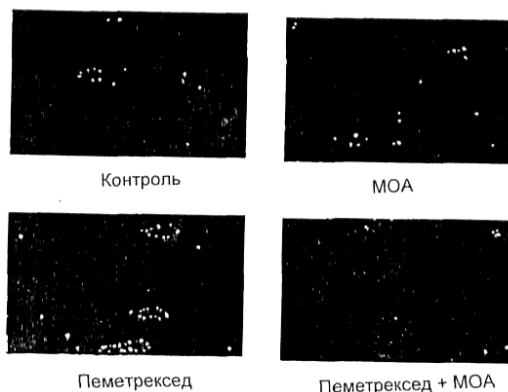
Таким чином, треба розуміти, що не є наміром у застосуванні таких термінів вилучення будь-якого еквіваленту показаних та описаних особливостей або їх частин, але визначено, що різні модифікації є можливими у рамках винаходу. Це охоплює загальний опис винаходу. Усі патенти, публікації, веб-сайти, та інші документи та матеріали, згадані тут є показовими для спеціалістів, котрих винахід стосується, та кожний такий згаданий документ та матеріал уведено як посилання.

Лужний кометний аналіз

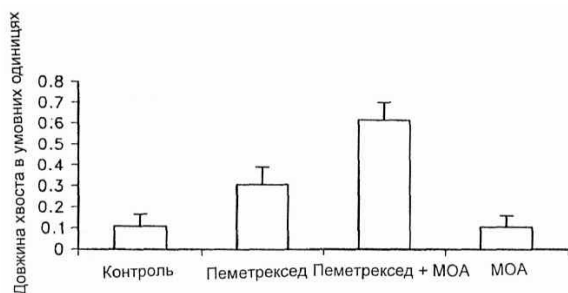


Фіг.1А

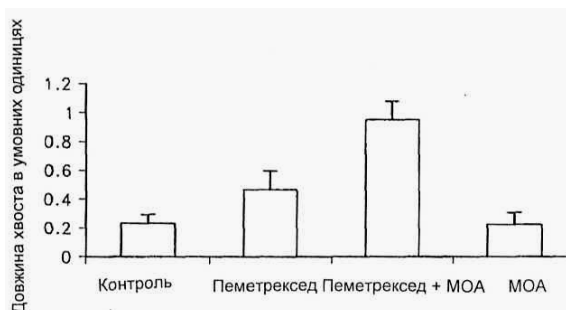
Нейтральний кометний аналіз



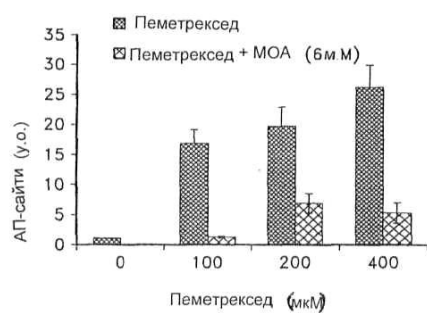
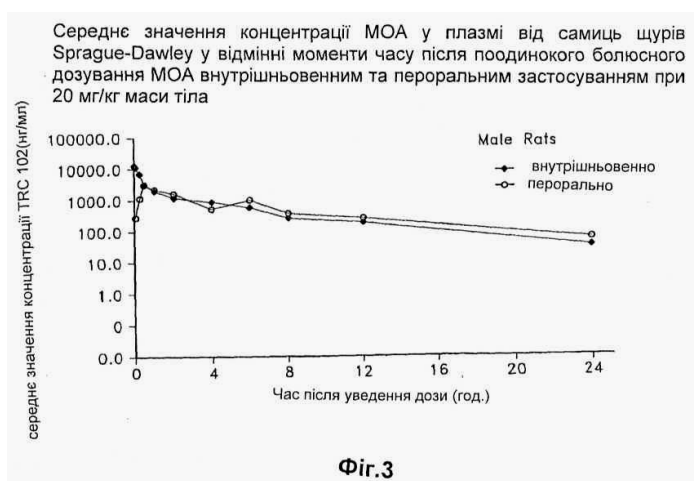
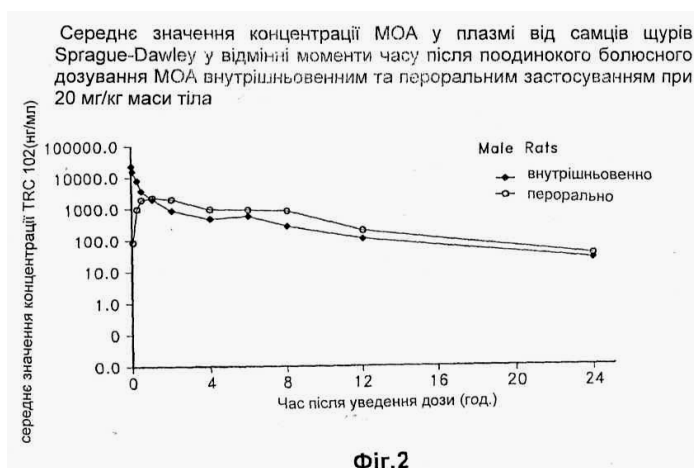
Фіг.1В



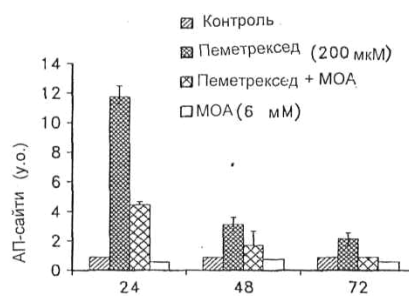
Фіг.1С



Фіг.1D



Фіг.4А



Фіг.4В

МОА-АП-сайти, стійкі до відновлення АП-ендонуклеазою

Схематична діаграма отримання
олігонуклеотидних субстратів з вмістом
АП-сайту або МОА-АП-сайту

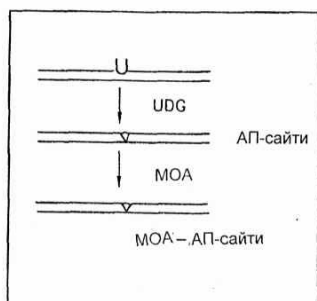


Fig.5A

АП-ендонуклеаза має реакційність до
розщеплення АП-сайту, але не МОА-
АП-сайту, що є стійким відносно
регенерації АП-ендонуклеазою

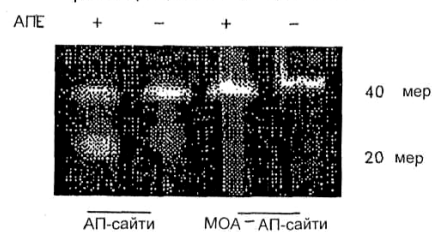


Fig.5B

Комбінація пеметрекседу та TRC2
посилює розриви подвійного ланцюга
ДНК та апоптоз, що є незалежним від
шляху Bcl2

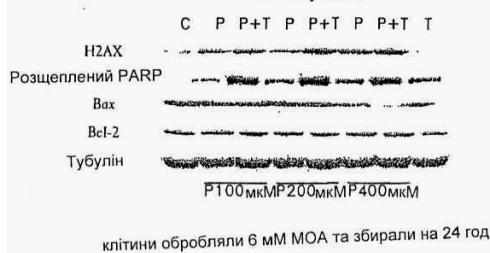
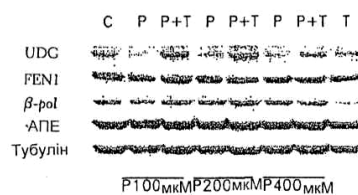


Fig.6

Рівні BER-білку у клітинах H460 до та
після обробки пеметрекседом чи
комбінацією



Клітини обробляли 6 мМ МОА та збирали на 24 год.

Fig.7

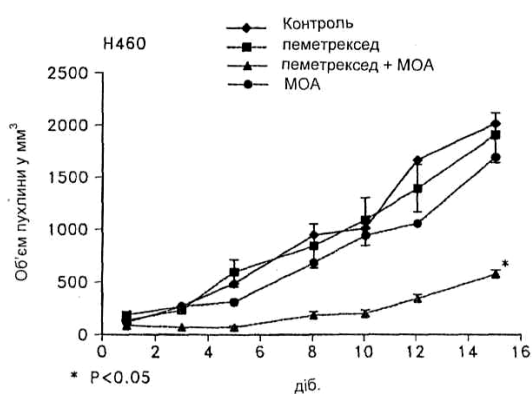


Fig.8A

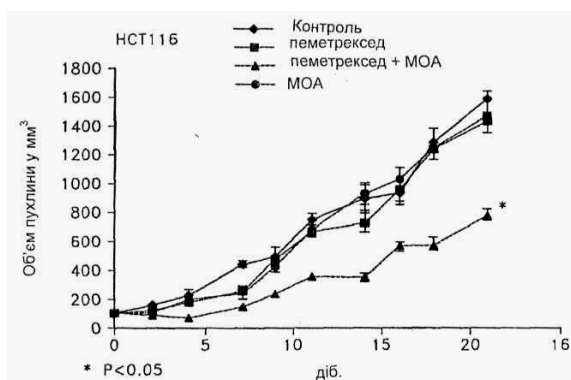


Fig.8B

