



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99934** (13) **C2**
(51) МПК (2012.01)

A61K 31/166 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

| | | | |
|--|---|---|--|
| (21) Номер заявки: | а 2010 07216 | (72) Винахідник(и): | Шерман Баррі М. (US), Бредлі Чарльз (US), Оссовская Валерія С. (US/RU) |
| (22) Дата подання заявки: | 11.11.2008 | (73) Власник(и): | БАЙПАР САЙЄНСІЗ, ІНК., 55 Corporate Drive Bridgewater, New Jersey 08807 (US) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 25.10.2012 | (74) Представник: | Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 60/987,333, 61/012,364, 61/058,528 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 2007/011962 A2, 25.01.2007 NASR FADY L ET AL: "Gemcitabine plus carboplatin combination therapy as second- line treatment in patients with relapsed breast cancer.", CLINICAL BREAST CANCER JUN 2004 LNKD- PUBMED:15245614, vol. 5, no. 2, June 2004 (2004-06), pages 117-122; XP002633901 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 12.11.2007, 07.12.2007, 03.06.2008 | | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | US, US, US | | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 12.07.2010, Бюл.№ 13 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 25.10.2012, Бюл.№ 20 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | PCT/US2008/083147, 11.11.2008 | | |

**(54) ЛІКУВАННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ СПОЛУКИ 4-ЙОДО-3-НІТРОБЕНЗАМІДУ
В КОМБІНАЦІЇ З ПРОТИПУХЛИННИМИ ЗАСОБАМИ**

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини та стосується лікування раку молочної залози, який є негативним щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR") і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2"), із застосуванням ефективної кількості 4-йодо-3-нітробензаміду або його метаболіту, або фармацевтично прийнятої солі, гемцитабіну і карбоплатину.

UA 99934 C2

Перехресне посилання

Ця патентна заявка претендує на пріоритет за попередньою заявкою США з реєстраційним № 60/987,333, що має назву "Лікування потрійного негативного метастатичного раку молочної залози у поєднанні з антиметаболітом, комплексом платини та інгібітором PARP", зареєстрованої 12 листопада 2007 року (№ у реєстрі патентних повірених 28825-742.101); попередньою заявкою США з реєстраційним № 61/012,364, що має назву "Лікування раку у поєднанні інгібіторами топоізомерази та інгібіторами PARP", зареєстрованої 7 грудня 2007 року (№ у реєстрі патентних повірених 28825-747.101); та попередньою заявкою США з реєстраційним № 61/058,528, під назвою "Лікування раку молочної залози, яєчника та матки інгібітором PARP", зареєстрованої 3 червня 2008 року (№ у реєстрі патентних повірених 28825-757.101), при цьому кожна з цих заявок включена до даної заявки у повному обсязі шляхом посилання.

Передумови

Рак належить до групи захворювань, які відзначаються порушенням контролю за ростом клітин. Тільки у Сполучених Штатах щорічна захворюваність на рак оцінюється у понад 1.3 мільйони випадків. Попри застосування хірургії, опромінення, хіміотерапії та гормонів з метою лікування раку, він залишається другою головною причиною смерті у США. Згідно оцінок понад 560.000 американців щороку помирають від раку.

Раку клітини одночасно активують декілька метаболічних шляхів, що позитивно та негативно регулюють ріст клітин та некроз клітин. Ця характерна особливість наводить на думку, що модуляція некрозу клітин та ознаки виживання можуть забезпечити нові стратегії підвищення ефективності існуючих видів хіміотерапевтичного лікування.

Рак молочної залози зазвичай лікується шляхом поєднання хірургії з метою видалення ракового утворення та ад'ювантної терапії - опромінення, хіміотерапії чи обох цих засобів - з метою впливу на будь-які раку клітини, що могли залишитися після хірургічного втручання. Рак молочної залози може широко класифікуватися за наявністю чи відсутністю рецепторів гормону (HR). Рак з позитивним рецептором гормону (HR+) відзначається експресією одного чи обох жіночих рецепторів гормону - естрогеновий рецептор (ER) чи прогестероновий рецептор (PR). Ад'ювантна терапія для ER+ раку молочної залози часто включає хіміотерапію із селективним модулятором естрогенових рецепторів (SERM), таких як тамоксифен чи ралоксифен. Нажаль, оскільки близько 70 % раку молочної залози є ER-позитивним, решта 30 % раку молочної залози, що є HR-негативним, не піддається лікуванню модуляторами SERM. Відповідно, інші види ад'ювантної хіміотерапії, такі як лікування антрацикліном (окремо чи в поєднанні з таксаном), були випробувані на ER-негативному раку молочної залози.

Лікування антрацикліном обмежується максимально допустимою дозою протягом життя, що пов'язана з питаннями кардіотоксичності. Лікування гемцитабіном та карбоплатином є визначеною комбінацією хіміотерапії для пацієнтів, що мають метастатичний рак молочної залози - чи без застосування таксану чи з попереднім застосуванням таксану. Агенти платини продемонстрували багатообіцяючу протипухлинну активність щодо базально-подібного місцево-прогресуючого раку молочної залози. Агенти, що руйнують ДНК, мають багатообіцяючу протипухлинну ефективність проти базально-подібного раку молочної залози, внаслідок дефектів у шляхах репарації ДНК, що є притаманними цьому виду раку молочної залози.

Незважаючи на існування антиметаболітів, таких як гемцитабін та агенти комплексу платини, такі як карбоплатин, не існує загальноприйнятого стандарту лікування ER-негативного раку молочної залози. Зокрема, тричі негативний метастатичний рак молочної залози (тобто рак молочної залози, що є ER-негативним, та/чи PR-негативним, та/чи негативним щодо рецептору 2 (HER2) людського епідермального фактору росту) є стійким до стандартного лікування та повністю стійким до хіміотерапії SERM. Таким чином, існує потреба в ефективному лікуванні раку загалом, та зокрема у лікуванні тричі негативного метастатичного раку молочної залози.

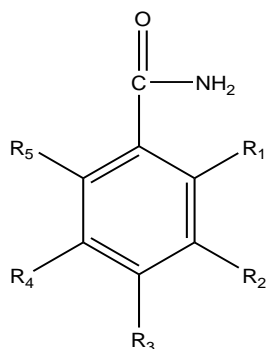
Попри існування обмеженої кількості варіантів терапевтичного лікування раку, види раку, включаючи тричі негативний рак молочної залози, є особливо складними, оскільки вони можуть бути стійкими до стандартного хіміотерапевтичного чи гормонального лікування. Таким чином, існує потреба в ефективному лікуванні раку загалом, та окремих видів раку.

Загальний опис винаходу

У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2 у пацієнта, який передбачає призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2 у пацієнта, який його потребує, що включає: (a) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: чи рак є ER-позитивним чи ER-негативним;

чи рак є PR-позитивним чи PR-негативним; чи рак є HER2-позитивним чи HER2-негативним; (с) якщо дослідження вказує на те, що рак є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2, лікування пацієнта принаймні одним інгібітором PARP. У деяких варіантах, спосіб також включає лікування пацієнта принаймні одним інгібітором PARP, якщо мають місце дві чи більше наступних умов: (а) рак є ER-негативним, (b) рак є PR-негативним, (с) рак є HER2-негативним. У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2 у пацієнта, який включає: (а) дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії PARP; та (b) якщо експресія PARP перевищує встановлений рівень, призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP.

Практикуючи будь-який зі способів, що розкриваються у цій заявці, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект виражається у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченню метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, стабільності хвороби чи повній патоморфологічній регресії. У деяких варіантах, отримано порівняльний показник клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) при лікуванні інгібітором PARP порівняно з лікуванням протипухлинним агентом. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 30% порівняно із лікуванням лише самим протипухлинним агентом. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У деяких варіантах, інгібітор PARP-1 є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, інгібітор PARP має Формулу (IIa) чи є її метаболітом:



(IIa)

, Формула (IIa)

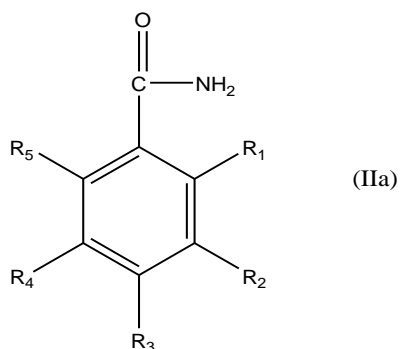
де або: (1) принаймні один з замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди замісником, що містить сірку, та решта замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 незалежно обрані серед групи, що складається з водню, гідроксилу, аміно-, нітро-, йодо-, бромо-, фтор-, хлор-, (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_6) алкоксилу, (C_3-C_7) циклоалкілу та фенілу, де принаймні два з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди воднем; чи (2) принаймні один з замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 не є замісником, що містить сірку та принаймні один з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди йодо-, та де зазначений йодо-є завжди суміжним з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є або нітро-, нітрузо, гідроксиламіною, гідроксиловою чи аміною групою; та їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів, ізомерів, таутомерів, метаболітів, аналогів чи проліків. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є нітрузо-, гідроксиламіною, гідроксиловою чи аміною групою. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є нітрузо-, гідроксиламіною чи аміною групою.

У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, стадії II чи стадії III. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та де рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози має дефіцит на репарацію ДНК шляхом гомологічної рекомбінації. У деяких варіантах, рак молочної залози має порушення функції BRCA1 чи BRCA2. У деяких варіантах, лікування передбачає лікувальний цикл принаймні 11 днів, де на 1, 4, 8 та 11 день циклу, пацієнт отримує від близько 1 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід приймається перорально, шляхом парентеральної ін'єкції чи вливання (інфузії), чи інгаляції. У деяких варіантах, цикл лікування має тривалість від близько 11 до близько 30 днів. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з принаймні одним протипухлинним агентом. Протипухлинний агент є протипухлинним алкілювальним агентом, протипухлинним антиметаболітом, протипухлинними

антибіотиками, протипухлинним агентом рослинного походження, протипухлинним комплексом платини, протипухлинною похідною камптотецину, протипухлинним інгібітором тирозин кінази, моноклональним антитілом, інтерфероном, модифікатором біологічного відгуку, гормональним протипухлинним агентом, протипухлинним вірусним агентом, інгібітором ангіогенезу, диференціюючим агентом, інгібітором PI3K/mTOR/AKT, інгібітором клітинного циклу, інгібітором апоптозу, інгібітором hsp 90, інгібітором тубуліну, інгібітором репарації ДНК, протиангіогенним агентом, інгібітором тирозин кінази рецептору, інгібітором топоізомерази, таксаном, агентом, націленим на Her-2, антагоністом гормону, агентом, націленим на рецептор фактору росту, чи їх фармацевтично прийнятною сіллю. У деяких варіантах, протипухлинний агент є цитабіном, сарецитабіном, валопіцитабіном чи гемцитабіном. У деяких варіантах, протипухлинний агент обирається серед групи, що складається з Авастину, Сутенту, Нексавару, Рецентину, АВТ-869, Акситинібу, Іринотекану, Топотекану, паклітакселу, доцетакселу, лапатинібу, Герцептину, лапатинібу, тамоксифену, інгібітору стероїдної ароматази, інгібітору нестероїдної ароматази, Фулвестранту, інгібітору рецептора епідермального фактору росту (EGFR), Цетуксімабу, Панітумімабу, інгібітору інсуліноподібного рецептору фактору росту 1 (IGF1R), та CP-751871. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з більш ніж одним протипухлинним агентом. У деяких варіантах, протипухлинний агент призначається до, як супутній чи після призначення інгібітору PARP. У деяких варіантах, спосіб також включає хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, генну терапію, терапію ДНК, вірусну терапію, терапію РНК, терапію ДНК, ад'ювантну терапію, неoad'ювантну терапію, імунотерапію, нанотерапію чи їх поєднання. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з гамма опроміненням. У деяких варіантах, зразком є тканина чи зразок рідини організму. У деяких варіантах, зразком є зразок пухлини, зразок крові, зразок плазми крові, зразок рідини черевної порожнини, ексудат чи випіт. У деяких варіантах, спосіб також включає дослідження зразка пацієнта на предмет експресії естрогенового рецептору, прогестеронового рецептору чи рецептору людського епідермального фактору росту 2.

У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP у поєднанні з принаймні одним протипухлинним агентом. У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який цього потребує, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: чи рак є ER-позитивним чи ER-негативним; чи рак є PR-позитивним чи PR-негативним; чи рак є HER2-позитивним чи HER2-негативним; (c) якщо дослідження вказує на те, що рак є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2, лікування пацієнту у поєднанні з терапевтичними агентами, де терапевтичні агенти включають принаймні один інгібітор PARP та принаймні один протипухлинний агент. У деяких варіантах, спосіб також включає лікування пацієнта у поєднанні з терапевтичними агентами, де терапевтичні агенти включають принаймні один інгібітор PARP та принаймні один протипухлинний агент, за наявності двох чи більше наступних умов наступних умов: (а) рак є ER-негативним, (b) рак є PR-негативним, (c) рак є HER2-негативним. У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає: (а) дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії PARP; та (b) якщо експресія PARP перевищує визначений рівень, призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP та принаймні одного протипухлинного агента.

Практикуючи будь-який зі способів, що розкриваються у цій заявці, у деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, стабільності хвороби чи повній патоморфологічній регресії. У деяких варіантах, досягнуто покращення показника клінічної ефективності (CBR = CR + PR + SD \geq 6 місяців) порівняно з лікуванням протипухлинним агентом, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, інгібітор PARP є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, інгібітор PARP має Формулу (IIa) чи є її метаболітом:



, Формула (IIa)

де або: (1) принаймні один з замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди замісником, що містить сірку, та решта замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 незалежно обрані серед групи, що складається з водню, гідроксилу, аміно-, нітро-, йодо-, бромо-, фтор-, хлор-, (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_6) алкоксилу, (C_3-C_7) циклоалкілу та фенілу, де принаймні два з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди воднем; чи (2) принаймні один з замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 не є замісником, що містить сірку та принаймні один з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди йодо-, та де зазначений йодо- є завжди суміжним з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є або нітро-, нітрозоз-, гідроксиламіновою, гідроксиловою чи аміновою групою; та їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів, ізомерів, таутомерів, метаболітів, аналогів чи проліків. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є нітрозоз-, гідроксиламіновою, гідроксиловою чи аміновою групою. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 чи R_5 , яка є нітрозоз-, гідроксиламіновою чи аміновою групою.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним алкілувальним агентом, протипухлинним антиметаболітом, протипухлинним антибіотиком, протипухлинним агентом рослинного походження, протипухлинним комплексом платини, протипухлинною похідною камптотецину, протипухлинним інгібітором тирозин кінрази, моноклональним антитілом, інтерфероном, модифікатором біологічного відгуку, гормональним протипухлинним агентом, протипухлинним вірусним агентом, інгібітором ангіогенезу, диференціюючим агентом, інгібітором PI3K/mTOR/AKT, інгібітор клітинного циклу, інгібітор апоптозу, інгібітором hsp 90, інгібітором тубуліну, інгібітором репарації ДНК, протиангіогенним агентом, інгібітором тирозин кінрази рецептору, інгібітором топоізомерази, таксаном, агентом, націленим на Her-2, антагоністом гормону, агентом, націленим на рецептор фактору росту, чи їх фармацевтично прийнятною сіллю. У деяких варіантах, протипухлинний агент є цитабіном, сарецитабіном, валопіцитабіном чи гемцитабіном. У деяких варіантах, протипухлинний агент обирається серед групи, що складається з Авастину, Сутенту, Нексавару, Рецентину, АВТ-869, Акситинібу, Іринотекану, Топотекану, паклітакселу, доцетакселу, лапатинібу, Герцептину, лапатинібу, тамоксифену, інгібітору стероїдної ароматази, інгібітору нестероїдної ароматази, Фулвестранту, інгібітору рецептора епідермального фактору росту (EGFR), Цетуксімабу, Панітумімабу, інгібітору інсуліноподібного рецептору фактору росту 1 (IGF1R) та CP-751871. У деяких варіантах, спосіб також включає хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, генну терапію, терапію ДНК, вірусну терапію, терапію ДНК, ад'ювантну терапію, неоад'ювантну терапію, терапію РНК, імунотерапію, нанотерапію чи їх поєднання. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з гамма опроміненням.

У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, стадії II чи стадії III. У деяких варіантах, рак молочної залози є HR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та де рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози має дефіцит на репарацію ДНК шляхом гомологічної рекомбінації. У деяких варіантах, рак молочної залози має порушення функції BRCA1 чи BRCA2. У деяких варіантах, лікування передбачає лікувальний цикл принаймні 11 днів, де: (а) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-5000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу, пацієнт отримує від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, цикл лікування має тривалість від близько 11 до близько 30 днів. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-2500 мг/м²

гемцитабіну та від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 500-2000 мг/м² гемцитабіну та від близько 50 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 1000 мг/м² гемцитабіну та близько AUC 2 карбоплатину; та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує близько 1, 2, 3, 4, 6, 8 чи 10, 12, 14, 16, 18 чи 20 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду. У деяких варіантах, протипухлинний агент вводиться шляхом парентеральної ін'єкції чи вливання. У деяких варіантах, інгібітор PARP є 4-йодо-3-нітробензамідом, який призначається перорально, чи шляхом парентеральної ін'єкції чи вливання, чи інгаляції. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану шляхом парентеральної ін'єкції чи вливання. У деяких варіантах, зразком є тканина чи зразок рідини організму. У деяких варіантах, зразком є зразок пухлини, зразок крові, зразок плазми крові, зразок рідини черевної порожнини, ексудат чи випіт. У деяких варіантах, спосіб також включає дослідження зразка пацієнта на предмет експресії естрогенового рецептора, прогестеронового рецептора чи рецептора людського епідермального фактору росту 2.

Включення шляхом посилання

Усі публікації та патентні заявки, що згадуються у цій специфікації включені до неї шляхом посилання у такому ж об'ємі, як і кожна окрема публікація чи патентна заявка, що була конкретно та окремо зазначена, як така, що є включеною шляхом посилання.

Стислий опис фігур

Ознаки новизни винаходу визначені докладно у формулі винаходу, що додається. Краще розуміння ознак та переваг даного винаходу буде досягнуто шляхом посилання на наступний детальний опис, який містить ілюстративні варіанти, у яких використовуються принципи винаходу, та його супроводжувальні фігури:

ФІГУРА 1 зображує підвищення функціональної активності генної експресії PARP1 у людського первинного раку. Горизонтальна лінія, медіанна експресія PARP1; блочна діаграма, інтерквартильна широта; стовпчики, стандартне відхилення.

ФІГУРА 2 зображує ефект 4-йодо-3-нітробензаміду плюс карбоплатин чи гемцитабіну на розвитку *in vitro* клітинного циклу TNBC. Життєздатність клітин MDA-MB-463 TNBC визначена кількісно за допомогою аналізу FACS.

ФІГУРА 3 зображує пригнічення PARP у периферійних мононуклеарних клітинах крові (PMBCs) пацієнтів, які отримують 4-йодо-3-нітробензамід.

ФІГУРА 4 зображує аналіз спектру експресії PARP1, ER, PR та HER2 у зразках людської пухлини молочної залози на прикладі дослідження Стадії 2 метастатичного TNBC (тричі негативного раку молочної залози). Дані нормалізовані відповідно до генної експресії бета-глобінглікозидази. Дані представляють аналіз 50 клінічних зразків раку молочної залози та 19 зразків нормальної молочної залози. Вертикальна лінія представляє медіанну генну експресію, а блочна діаграма представляє інтерквартильну широту.

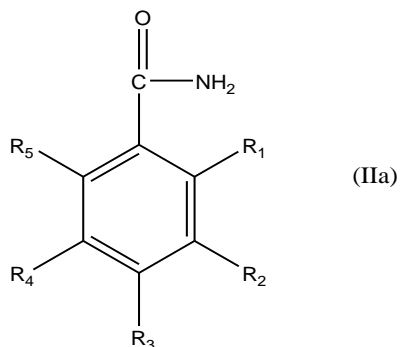
ФІГУРА 5 зображує криву Каплана-Мейера PFS (виживання без прогресування захворювання) у пацієнтів з метастатичним TNBC, які отримують 4-йодо-3-нітробензамід плюс гемцитабін/карбоплатин порівняно з самим гемцитабін/карбоплатин. Розподіл PFS за двома напрямками лікування було підсумовано з а допомогою методу Каплана-Мейера. Два напрями порівнюються за допомогою 2-стороннього логарифмічного рангового критерію при 5 % рівні достовірності. G/C, гемцитабін/карбоплатин; G/C+BA, гемцитабін/карбоплатин + 4-йодо-3-нітробензамід (BA).

ФІГУРА 6 зображує, що 4-йодо-3-нітробензамід (BA) потенціює зупинку клітинного циклу S- та G2/M та посилює протипроліферативний ефект гамма опромінення у людських клітинах MDA-MB-468, уражених тричі негативним раком молочної залози.

Детальний опис винаходу

У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2 у пацієнта, який включає призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, отримано порівняльний показник клінічної ефективності (CBR = CR + PR + SD \geq 6 місяців) шляхом лікування інгібітором PARP порівняно з лікуванням протипухлинним агентом. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 30

%. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У деяких варіантах, інгібітор PARP має Формулу (IIa) чи є її метаболітом:



, Формула (IIa)

5

де або: (1) принаймні один із замісників R₁, R₂, R₃, R₄ та R₅ є завжди замісником, що містить сірку, та решта замісників R₁, R₂, R₃, R₄ та R₅ незалежно обрані серед групи, що складається з водню, гідроксилу, аміно-, нітро-, йодо-, бромо-, фтор-, хлор-, (C₁-C₆) алкілу, (C₁-C₆) алкоксилу, (C₃-C₇) циклоалкілу та фенілу, де принаймні два з п'яти замісників R₁, R₂, R₃, R₄ та R₅ є завжди воднем; чи (2) принаймні один з замісників R₁, R₂, R₃, R₄ та R₅ не є замісником, що містить сірку та принаймні один з п'яти замісників R₁, R₂, R₃, R₄ та R₅ є завжди йодо-, та де зазначений йодо-є завжди суміжним з групою R₁, R₂, R₃, R₄ чи R₅, яка є або нітро-, нітрозо-, гідроксиламіною, гідроксиловою чи аміною групою; та їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів, ізомерів, таутомерів, метаболітів, аналогів чи проліків. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R₁, R₂, R₃, R₄ чи R₅, яка є нітрозо-, гідроксиламіною, гідроксиловою чи аміною групою. У деяких варіантах, інгібітор PARP 1 є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом.

У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, II чи стадії III. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, а також як HER2-позитивним, так і PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, а також як ER-позитивним, так і HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним, а також як ER-позитивним, так і PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER-2 позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, HER2-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози має дефіцит на репарацію ДНК шляхом гомологічної рекомбінації.

У деяких варіантах, лікування передбачає цикл лікування принаймні 11 днів, де на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально, та шляхом парентеральної ін'єкції чи вливання, чи інгаляції. У деяких варіантах, цикл лікування триває від близько 11 до близько 30 днів.

У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з принаймні одним протипухлинним агентом. Протипухлинний агент є протипухлинним алкілувальним агентом, протипухлинним антиметаболітом, протипухлинним

антибіотиком, протипухлинним агентом рослинного походження, протипухлинною органічною сполукою платини, протипухлинною похідною камптотецину, протипухлинним інгібітором тирозин кінази, моноклональним антитілом, інтерфероном, модифікатором біологічного відгуку, гормональним протипухлинним агентом, протипухлинним вірусним агентом, інгібітором ангіогенезу, диференціюючим агентом чи іншим агентом, який відзначається протипухлинною активністю, чи їх фармацевтично прийнятною сіллю. У деяких варіантах, протипухлинний агент є цитабіном, сарецитабіном, валопіцитабіном чи гемцитабіном. У деяких варіантах, протипухлинний агент є комплексом платини. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з більш ніж одним протипухлинним агентом. Протипухлинний агент призначається до, як супутній чи після призначення інгібітору PARP. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з протиангіогенним агентом, таким як Авастин. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з інгібітором топоізомерази, таким як іринотекан чи Топотекан. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з таксаном, таким як паклітаксел чи доцетаксел. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з агентом, націленим на Her-2, таким як Герцептин. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з гормональною терапією, такою як антагоніст гормону тамоксифен. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з агентом, націленим на рецептор фактору росту, включаючи інгібітор рецептору епідермального фактору росту (EGFR) та інгібітор інсуліноподібного рецептору (IGF1R) фактору росту 1 (IGF-1). У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з гамма опроміненням. У деяких варіантах, спосіб також включає хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, генну терапію, терапію ДНК, ад'ювантну терапію, неoad'ювантну терапію, терапію РНК, терапію ДНК, вірусну терапію, імунотерапію, нанотерапію чи їх поєднання.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP та принаймні одного протипухлинного агента. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням антиметаболітом та комплексом платини, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з дисплатину, карбоплатину, оксаплатину та оксаліплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є цитабіном. У деяких варіантах, антиметаболіт обрано серед групи, що складається з цитабіну, сарецитабіну, гемцитабіну та валопіцитабіну. У деяких варіантах, антиметаболіт є гемцитабіном. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану. У деяких варіантах, таксан є паклітакселем чи доцетакселем. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, II чи III. У деяких варіантах, рак молочної залози є HR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є HR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, а також як HER2-позитивним, так і PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, а також як ER-позитивним, так і HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним, а також як ER-позитивним, так і PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної

залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER-2 позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, HER2-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози має дефіцит на репарацію ДНК шляхом гомологічної рекомбінації.

У деяких варіантах, способи також включають призначення інгібітору PARP у поєднанні з протипухлинним агентом. У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним алкілувальним агентом, протипухлинним антиметаболітом, протипухлинними антибіотиками, протипухлинним агентом рослинного походження, протипухлинним комплексом платини, протипухлинною похідною камптотецину, протипухлинним інгібітор тирозин кінрази, моноклональним антитілом, інтерфероном, модифікатором біологічного відгуку, гормональним протипухлинним агентом, інгібітором ангиогенезу, диференціюючим агентом чи іншим агентом, який відзначається протипухлинною активністю, чи їх фармацевтично прийнятною сіллю. У деяких варіантах, комплекс платини є цисплатином, карбоплатином, оксеплатином чи оксалиплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є цитабіном, сарецитабіном, гемцитабіном чи валопіцитабіном. У деяких варіантах, способи також включають призначення пацієнтові інгібітору PARP у поєднанні з більш ніж одним протипухлинним агентом. У деяких варіантах, протипухлинний агент призначається до, як супутній чи після прийому інгібітору PARP. У деяких варіантах, протипухлинний агент є протиангіогенним агентом, таким як Авастин. У деяких варіантах, протипухлинний агент є інгібітором топоізомерази, включаючи, але не обмежуючись, іринотекан, Топотекан, чи камптотецин. У деяких варіантах, протипухлинний агент є таксаном, включаючи, але не обмежуючись, паклітаксел чи доцетаксел. У деяких варіантах, протипухлинний агент є агентом, націленим на Her-2, наприклад, Герцептин. У деяких варіантах, протипухлинний агент є антагоністом гормону, наприклад, тамоксифен. У деяких варіантах, протипухлинний агент є агентом, націленим на рецептор фактору росту. У деяких варіантах, таким агентом є інгібітор рецептору (EGFR) епідермального фактору росту чи інгібітор рецептору (IGF1R) інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1). У інших варіантах, спосіб також включає хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, генну терапію, терапію ДНК, ад'ювантну терапію, неoad'ювантну терапію, вірусну терапію, терапію РНК, імунотерапію, нанотерапію чи їх поєднання.

У деяких варіантах, лікування передбачає цикл лікування принаймні 11 днів, де на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, лікування передбачає лікувальний цикл принаймні 11 днів, де на 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, лікування передбачає цикл лікування принаймні 11 днів, де на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує близько 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, чи 10, 12, 14, 16, 18, чи 20 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду.

У деяких варіантах, лікування передбачає цикл лікування принаймні 11 днів, де: (а) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-2000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-2500 мг/м² гемцитабіну та близько AUC 1-5 карбоплатину (від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину); та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 500-2000 мг/м² гемцитабіну та від близько 50 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 1 до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту метаболіту. У деяких варіантах, на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 1000 мг/м² гемцитабіну та близько AUC 2 карбоплатину; та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує близько 1, 2, 3, 4, 6, 8 чи 10, 12, 14, 16, 18 чи 20 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду.

Деякі варіанти описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який має тричі негативний рак молочної залози, з циклом лікування тривалістю 21 день, при цьому на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт призначається від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який має

тричі негативний рак молочної залози, з циклом лікування тривалістю 21 день: (а) на 1 та 8 дні циклу пацієнту призначають близько 100-2000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу пацієнту призначають AUC 0.1-10 карбоплатину (від близько 10 до 400 мг/м² карбоплатину); та (с) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнту призначають від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, гемцитабін вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, гемцитабін вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід вводиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який має тричі негативний рак молочної залози, що включає: (а) визначення циклу лікування тривалістю від близько 10 до близько 30 днів; (b) протягом від 1 до 10 окремих днів циклу, призначення пацієнтові від близько 1 мг/кг до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який має тричі негативний рак молочної залози, що включає: (а) визначення циклу лікування тривалістю від близько 10 до близько 30 днів; (b) протягом від 1 до 5 окремих днів циклу, призначення пацієнтові від близько 100 до близько 5000 мг/м² гемцитабіну шляхом внутрішньовенного вливання; (с) протягом від 1 до 5 окремих днів циклу, призначення пацієнтові від AUC 1 до AUC 10 карбоплатину шляхом внутрішньовенного вливання (наприклад, від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину); та (d) протягом від 1 до 10 окремих днів циклу, призначення пацієнтові від близько 1 мг/кг до близько 50 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду, чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, гемцитабін вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти включають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення принаймні одного з наступних: (i) чи рак є ER-позитивним чи ER-негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи PR-негативним; (iii) чи рак є HER2-позитивним чи HER2-негативним; (с) якщо дослідження свідчить про те, що рак є ER-негативним, PR-негативним чи HER2-негативним, лікування пацієнта у поєднанні з терапевтичними агентами, де терапевтичні агенти включають принаймні один антиметаболіт, принаймні один комплекс платини та принаймні один інгібітор PARP; та (d) якщо дослідження не свідчить про те, що рак є ER-негативним, PR-негативним чи HER2-негативним, вибір іншого варіанту лікування.

Деякі варіанти включають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення принаймні одного з наступних: (i) чи рак є ER-позитивним чи ER-негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи PR-негативним; (iii) чи рак є HER2-позитивним чи HER2-негативним; (с) якщо дослідження свідчить про те, що рак є ER-негативним, PR-негативним чи HER2-негативним, лікування пацієнта принаймні одним інгібітором PARP; та (d) якщо дослідження не свідчить про те, що рак є ER-негативним, PR-негативним чи HER2-негативним, вибір іншого варіанту лікування.

У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, отримано покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 30 %. У деяких варіантах, отримано покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням антиметаболітом та комплексом платини, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У інших варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з цисплатину, карбоплатину, оксаплатину та оксаліплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є

цитабіном. У деяких варіантах, антиметаболіт обрано серед групи, що складається з цитабіну, сарецитабіну, гемцитабіну та валопіцитабіну. У деяких варіантах, антиметаболіт є гемцитабіном. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом чи доцетакселом. У деяких варіантах, зразок є тканиною чи зразком рідини організму. У деяких варіантах, зразок є зразком пухлини, зразком крові, зразком плазми крові, зразком рідини черевної порожнини, ексудатом чи випотом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, II чи III. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, а також як PR-позитивним, так і HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, а також як ER-позитивним, так і HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та ER-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним, а також як ER-позитивним, так і PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним, HER2-негативним та PR-позитивним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним.

Деякі варіанти винаходу передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: (i) чи рак є ER-позитивним чи - негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи - негативним; (iii) чи рак є HER2-позитивним чи - негативним; (c) за наявності двох чи більше з наступних умов, лікування пацієнта принаймні одним інгібітором PARP: (i) рак є ER-негативним, (ii) рак є PR-негативним, чи (iii) рак є HER2-негативним; та (d) якщо принаймні наявні дві з вищезазначених умов, вибір іншого варіанту лікування. Деякі варіанти винаходу передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: (i) чи рак є ER-позитивним чи - негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи - негативним; (iii) чи рак є HER2-позитивним чи - негативним; (c) за наявності двох чи більше з наступних умов, лікування пацієнта у поєднанні з терапевтичними агентами, де терапевтичні агенти включають принаймні один антиметаболіт, принаймні один комплекс платини та принаймні один інгібітор PARP: (i) рак є ER-негативним, (ii) рак є PR-негативним, чи (iii) рак є HER2-негативним; та (d) якщо принаймні наявні дві з вищезазначених умов, вибір іншого варіанту лікування. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 30 %. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням антиметаболітом та комплексом платини, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, зразок є тканиною чи зразком рідини організму. У деяких варіантах, зразок є зразком пухлини, зразком крові, зразком плазми крові, зразком рідини черевної порожнини, ексудатом чи випотом. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У інших варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з цисплатину,

карбоплатину, оксаплатину та оксалиплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є цитабіном. У деяких варіантах, антиметаболіт обрано серед групи, що складається з цитабіну, сарецитабіну, гемцитабіну та валопіцитабіну. У деяких варіантах, антиметаболіт є гемцитабіном. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом чи доцетакселом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, II чи III. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, лікування передбачає вибір циклу лікування тривалістю принаймні 11 днів та: (а) на 1, 4, 8 та 11 дні цикл, пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід призначається перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, лікування передбачає вибір циклу лікування принаймні 11 днів та: (а) на 1 та 8 дні циклу, пацієнт отримує близько 100-2000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу, пацієнт отримує від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та (c) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, гемцитабін вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід вводиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, що розкриваються у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: (i) чи рак є ER-позитивним чи - негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи - негативним; та (iii) чи рак є HER2-позитивним чи - негативним; (c) за наявності двох чи більше з наступних умов, лікування пацієнта принаймні одним інгібітором PARP: (i) рак є ER-негативним, (ii) рак є PR-негативним, чи (iii) рак є HER2-негативним; та (d) за відсутності двох чи більше умов (i)-(iii), вибір іншого варіанту лікування.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування ER-негативного, PR-негативного, HER-2 негативного метастатичного раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає призначення зазначеному пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності (CBR = CR + PR + SD \geq 6 місяців) порівняно з лікуванням без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 30 %. У деяких варіантах, пацієнтові призначають дві чи більше терапевтичних сполуки у формі єдиної дози. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У інших варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, лікування передбачає цикл лікування тривалістю принаймні 11 днів та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід вводиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає: (а) дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії PARP; та (b) якщо експресія PARP перевищує визначений рівень, призначення пацієнтові принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений

принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням без інгібітору PARP. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 30 %. У деяких варіантах, інгібітор PARP є інгібітором PARP-1. У інших варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози.

У деяких варіантах, спосіб також включає дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії естрогенового рецептору, прогестеронового рецептору чи рецептору людського епідермального фактору росту 2. У деяких варіантах, рак молочної залози є HR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, лікування передбачає вибір циклу лікування тривалістю принаймні 11 днів та на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід вводиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, що розкриваються у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення наступного: (i) чи рак є ER-позитивним чи - негативним; (ii) чи рак є PR-позитивним чи - негативним; та (iii) чи рак є HER2-позитивним чи - негативним; (с) за наявності двох чи більше з наступних умов, лікування пацієнта у поєднанні з терапевтичними агентами, де терапевтичні агенти включають принаймні один антиметаболіт, принаймні один комплекс платини та принаймні один інгібітор PARP: (i) рак є ER-негативним, (ii) рак є PR-негативним, чи (iii) рак є HER2-негативним; та (d) за відсутності двох чи більше умов (i)-(iii), вибір іншого варіанту лікування. У деяких варіантах, гемцитабін вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин вводиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід вводиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування ER-негативного, PR-негативного, HER-2 негативного метастатичного раку молочної залози у пацієнта, який потребує такого лікування, що включає призначення зазначеному пацієнтові принаймні одного антиметаболіту, принаймні одного комплексу платини та принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з лікуванням антиметаболітом та комплексом платини, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, показник клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, пацієнтові призначають дві чи більше терапевтичних сполуки у формі єдиної дози. У деяких варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з цисплатину, карбоплатину, оксаплатину та оксаліплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є цитабіном. У деяких варіантах, антиметаболіт обрано серед групи, що складається з цитабіну, сарецитабіну, гемцитабіну та валопіцитабіну. У деяких варіантах, антиметаболіт є гемцитабіном. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом чи доцетакселом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози знаходиться на стадії I, II чи III. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-

негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, лікування передбачає вибір циклу лікування тривалістю принаймні 11 днів та: (а) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-2000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, гемцитабін водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід водиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає: (а) дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії PARP; та (b) якщо експресія PARP перевищує визначений рівень, призначення пацієнтові принаймні одного антиметаболіту, принаймні одного комплексу платини та принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розмірів пухлини молочної залози, скороченні метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, досягається покращення показника клінічної ефективності (CBR = CR + PR + SD ≥ 6 місяців) порівняно з лікуванням антиметаболітом та комплексом платини, але без інгібітору PARP. У деяких варіантах, покращення показника клінічної ефективності становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з цисплатину, карбоплатину, оксаплатину та оксалиплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, антиметаболіт є цитабіном. У деяких варіантах, антиметаболіт обрано серед групи, що складається з цитабіну, сарецитабіну, гемцитабіну та валопіцитабіну. У деяких варіантах, антиметаболіт є гемцитабіном. У деяких варіантах, спосіб також включає призначення пацієнтові таксану. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом чи доцетакселом. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним раком молочної залози. У деяких варіантах, спосіб також включає дослідження зразка від пацієнта на предмет експресії естрогенового рецептору, прогестеронового рецептору чи рецептору людського епідермального фактору росту 2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з: ER, PR чи HER2; та рак молочної залози є позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2. У деяких варіантах, рак молочної залози є HR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є PR-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є HER2-негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та PR-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, рак молочної залози є ER-негативним, PR-негативним та HER2-негативним. У деяких варіантах, лікування передбачає вибір циклу лікування тривалістю принаймні 11 днів та: (а) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує близько 100-2000 мг/м² гемцитабіну; (b) на 1 та 8 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1, 4, 8 та 11 дні циклу пацієнт отримує від близько 10 до близько 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту. У деяких варіантах, гемцитабін водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід водиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Таким чином, варіанти, передбачені у цій заявці, включають лікування пацієнта принаймні трьома речовинами, що відрізняються за хімічним складом, однією з яких є антиметаболіт, однією з яких є комплекс, що містить платину, та однією з яких є інгібітор PARP. У деяких варіантах, одна чи більше з цих речовин має здатність бути представленою у різних фізичних формах - наприклад, вільна основа, солі (зокрема, фармацевтично прийнятні солі), гідрати, поліморфи, сольвати, метаболіти, тощо. Якщо інше не кваліфіковане у цій специфікації, використання хімічної назви має на меті охопити усі фізичні форми зазначеної хімічної речовини. Наприклад, наведення 4-йодо-3-нітробензаміду без подальшої кваліфікації має на меті у цілому охопити вільну основу, а також усі фармацевтично прийнятні солі, поліморфи, гідрати, метаболіти, тощо. Коли мається на меті обмежити розкриття чи пункти формули до конкретної фізичної форми, це буде чітко зрозуміло з контексту уривку чи пункту формули, у

яких з'являється посилення на сполуку.

У деяких варіантах, дане розкриття передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що включає призначення пацієнтові принаймні одного таксану, принаймні одного комплексу платини та принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, досягається принаймні один терапевтичний ефект, при цьому зазначений принаймні один терапевтичний ефект проявляється у зменшенні розміру пухлини молочної залози, скорочення метастазу, повній ремісії, частковій ремісії, повній патоморфологічній регресії чи стабілізації хвороби. У деяких варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, бензамід є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, комплекс платини обрано серед групи, що складається з цисплатину, карбоплатину, оксаплатину та оксалиплатину. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом чи доцетакселом. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом. У деяких варіантах, спосіб передбачає цикл лікування тривалістю принаймні 11 днів: (а) на 1 день циклу призначення пацієнтові близько 10-200 мг/м² паклітакселу; (b) на 1 день циклу призначення пацієнтові близько 10-400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1 день та двічі на тиждень протягом циклу призначення пацієнтові близько 1-100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду чи молярного еквіваленту його метаболіту.

У деяких варіантах, розкриття у цій специфікації передбачає спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає: (а) отримання зразка від пацієнта; (b) дослідження зразка з метою визначення рівня експресії PARP у зразку; (с) визначення, чи експресія PARP перевищує визначений рівень, та в разі його перевищення, призначення пацієнтові принаймні одного таксану, принаймні одного комплексу платини та принаймні одного інгібітору PARP. У деяких варіантах, спосіб також включає необов'язково вибір іншого варіанту лікування, якщо експресія PARP у зразку не перевищує визначений рівень. У деяких варіантах, рак є раком молочної залози, що є негативним щодо одного чи більше рецепторів гормону. У деяких варіантах, рак є раком молочної залози, що є негативним щодо HER2. У деяких варіантах, рак є негативним щодо естрогенового рецептору (ER), прогестинного рецептору (PR) чи HER2. У деяких варіантах, рак є позитивним щодо принаймні одного рецептору гормону чи HER2. У деяких варіантах, таксан є цисплатином, карбоплатином, оксаплатином чи оксалиплатином. У деяких варіантах, таксан є паклітакселом. У деяких варіантах, комплекс платини є цисплатином чи карбоплатином. У деяких варіантах, комплекс платини є карбоплатином. У деяких варіантах, інгібітор PARP є бензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, інгібітор PARP є 4-йодо-3-нітробензамідом чи його метаболітом. У деяких варіантах, зразок є зрізом пухлини чи рідиною організму.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає цикл лікування тривалістю 21 день: (а) на 1 день циклу призначення пацієнтові близько 750 мг/м² паклітакселу; (b) на 1 день циклу призначення пацієнтові близько 10-400 мг/м² карбоплатину; та (с) на 1 день циклу та далі двічі на тиждень призначення пацієнтові близько 1-100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду. У деяких варіантах, паклітаксел водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, карбоплатин водиться шляхом внутрішньовенного вливання. У деяких варіантах, 4-йодо-3-нітробензамід водиться перорально чи шляхом внутрішньовенного вливання.

Деякі варіанти, описані у цій заявці, передбачають спосіб лікування раку молочної залози у пацієнта, що включає: (а) визначення циклу лікування тривалістю від близько 10 до близько 30 днів; (b) протягом від 1 до 5 окремих днів циклу призначення пацієнтові від близько 100 до близько 2000 мг/м² паклітакселу шляхом внутрішньовенного вливання протягом від близько 10 до близько 300 хвилин; (с) протягом від 1 до 5 окремих днів циклу призначення пацієнтові близько 10-400 мг/м² карбоплатину шляхом внутрішньовенного вливання протягом від близько 10 до близько 300 хвилин; та (d) протягом від 1 до 10 окремих днів циклу призначення пацієнтові від близько 1 мг/кг до близько 8 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду протягом від близько 10 до близько 300 хвилин.

Таким чином, варіанти, передбачені у цій заявці, включають лікування пацієнта принаймні трьома речовинами, що відрізняються за хімічним складом, однією з яких є таксан (наприклад, паклітаксел чи доцетаксел), однією з яких є комплекс, що містить платину (наприклад, цисплатин чи карбоплатин, чи цисплатин), та однією з яких є інгібітор PARP (наприклад, ВА чи його метаболіт). У деяких варіантах, одна чи більше з цих речовин має здатність бути представленою у різних фізичних формах - наприклад, вільна основа, солі (зокрема, фармацевтично прийнятні солі), гідрати, поліморфи, сольвати, метаболіти, тощо. Якщо інше не кваліфіковане у цій специфікації, використання хімічної назви має на меті охопити усі фізичні форми зазначеної хімічної речовини. Наприклад, наведення 4-йодо-3-нітробензаміду без

подальшої кваліфікації має на меті у цілому охопити вільну основу, а також усі фармацевтично прийнятні солі, поліморфи, гідрати, метаболіти, тощо. Коли мається на меті обмежити розкриття чи пункти формули до конкретної фізичної форми, це буде чітко зрозуміло з контексту уривку чи пункту формули, у яких з'являється посилання на сполуку.

Терміни "ефективна кількість" чи "фармацевтично ефективна кількість" означають достатню кількість агенту для того, щоб забезпечити бажаний біологічний, терапевтичний та/чи профілактичний результат. Таким результатом може бути скорочення та/чи послаблення проявів, симптомів чи причин хвороби, чи будь-яка інша бажана зміна біологічної системи. Наприклад, "ефективною кількістю" для терапевтичного застосування є кількість сполуки нітробензаміду, яка розкривається у цій специфікації, самої по собі чи композиції, що включає сполуку нітробензаміду, потрібної відповідно до цієї специфікації для забезпечення клінічно суттєвого ослаблення хвороби. Відповідна ефективна кількість у кожному індивідуальному випадку може бути визначена спеціалістом зі звичайною кваліфікацією у даній галузі шляхом звичайного експерименту.

Під "фармацевтично прийнятним" чи "фармакологічно прийнятним" мається на увазі матеріал, який не є біологічно чи в інший спосіб небажаним, тобто, матеріал може призначатися особі, не завдаючи значних небажаних біологічних ефектів чи не взаємодіючи у шкідливий спосіб з будь-якими компонентами композиції, до складу якої він входить.

Термін "лікування" та його граматичні еквіваленти, у спосіб яким вони застосовуються в даній специфікації, включають досягнення терапевтичної користі та/чи профілактичної користі. Під терапевтичною користю мається на увазі знищення чи покращення розладів, що лежать в основі, та щодо яких здійснюється лікування. Наприклад, для пацієнта, хворого на рак, терапевтична користь передбачає знищення раку, що лежить в основі хвороби, чи покращення стану хворого. Також, терапевтична користь досягається шляхом знищення чи покращення одного чи більшої кількості фізіологічних симптомів, пов'язаних з розладом, що лежить в основі, у такий спосіб, що спостерігається покращення стану пацієнта, незважаючи на той факт, що пацієнт все ще може залишатися ураженим розладом, що лежить в основі. З метою профілактичної користі, спосіб відповідно до винаходу може бути застосовано, чи композиція відповідно до винаходу може бути призначена пацієнтові, якому загрожує розвиток раку, чи пацієнтові, у якого наявні прояви одного чи більшої кількості фізіологічних симптомів таких умов, навіть попри те, що діагностика стану могла не проводитися.

Протипухлинні агенти

Протипухлинні агенти, що можуть використовуватися у даному винаході включають, але не обмежуються, протипухлинні алкілувальні агенти, протипухлинні антиметаболіти, протипухлинні антибіотики, протипухлинні агенти рослинного походження, протипухлинний комплекс платини, протипухлинні похідні камптотецину, протипухлинні інгібітори тирозин кінази, моноклональні антитіла, інтерферони, модифікатори біологічного відгуку та інші агенти, що відзначаються протипухлинною активністю чи їх фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є алкілувальним агентом. Термін "алкілувальний агент" у цій специфікації загалом стосується агента, який утворює алкілову групу в реакції алкілювання, під час якої атом водню органічної сполуки заміщується алкіловою групою. Приклади протипухлинних алкілувальних агентів включають, але не обмежуються, N-оксид азотистий іприт, циклофосфамід, іфосфамід, мелфалан, бусульфан, мітобронітол, карбоксон, тіотепа, ранімулін, німулін, темозоломід чи кармулін.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є антиметаболітом. Термін "антиметаболіт" у цій специфікації включає, у широкому сенсі, речовини, які порушують нормальний метаболізм, та речовини, які пригнічують систему перенесення електронів з метою запобігання утворенню макроергічних посередників, внаслідок їх структурних чи функціональних подібностей до метаболітів, які є важливими для живих організмів (такі як, вітаміни, коферменти, амінокислоти та сахариди). Приклади антиметаболітів, які відзначаються протипухлинною активністю, включають, але не обмежуються, метотрексат, 6-меркаптопурин рибозиду, меркаптопурин, 5-фторурацил, тегафур, доксіфлуридин, кармур, цитарабін, оксифосфат цитарабіну, еноцитабін, S-1, гемцитабін, флударабін чи пеметрексед двонатрієвий, при цьому перевага надається 5-фторурацилу, S-1, гемцитабіну та їм подібним.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним антибіотиком. Приклади протипухлинних антибіотиків включають, але не обмежуються, актиноміцин D, доксорубіцин, даунорубіцин, неокарцинон, блеомицин, пепломицин, мітомицин C, акларубіцин, пірарубіцин, епірубіцин, зинон, стімалам, ідарубіцин, сіролімус чи валрубіцин. У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним агентом рослинного походження. Приклади протипухлинних агентів рослинного походження включають, але не обмежуються, вінкрістин,

вінбластин, віндезін, етопозид, собузоксан, доцетаксел, паклітаксел та вінорелбін, при цьому перевага надається доцетакселу та паклітакселу.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є похідною камптотецину, яка відзначається протипухлинною активністю. Приклади протипухлинних похідних камптотецину включають, але не обмежуються, камптотecin, 10-гідроксилкамптотecin, Топотекан, іринотекан чи 9-амінокамптотecin, при цьому перевага надається камптотecin, Топотекану та іринотекану. Крім того, іринотекан метаболізує *in vivo* та виявляє протипухлинний ефект як SN-38. Механізм дії та активність похідних камптотecin вважаються фактично такими ж як і самого камптотecin (наприклад, Нітта та інші, Ган ту Кагаку Ріохо, 14, 850-857 (1987)).

У деяких варіантах, протипухлинний агент є органічною сполукою платини чи комплексом платини, який відзначається протипухлинною активністю. Органічна сполука платини у цій специфікації стосується сполуки, що містить платину, яка містить платину в іонній формі. Органічні сполуки платини, яким надається перевага, включають, але не обмежуються, цисплатин; цис-діамін-діакво-платина (II)-іон; хлор(диетилентриамін)-платина (II) хлорид; дихлор(етилендіамін)-платина (II); діамін(1,1-циклобутандикарбоксилато-) платина (II) (карбоплатин); спіроплатин; іпроплатин; діамін(2-етилмалонато-) платина (II); етилен-діамін-малонато-платина (II); аква(1,2-діаміно-дициклогексан-) сульфатоплатина (II); аква(1,2-діамінодициклогексан-) малонато-платина (II); (1,2-діаміноциклогексан-) малонато-платина (II); (4-карбоксифталато) (1,2-діаміноциклогексан) платина (II); (1,2-діаміноциклогексан)-(ізоцитрато-) платина (II); (1,2-діаміноциклогексан-) оксалато-платина (II); ормаплатин; тетраплатин; карбоплатин, недаплатин та оксаліплатин, при цьому перевага надається карбоплатину чи оксаліплатину. Крім того, інші протипухлинні органічні сполуки платини, що згадуються у специфікації, є відомими та наявними у продажу, та/чи можуть бути виготовлені спеціалістом зі звичайною кваліфікацією у даній галузі з використанням традиційних способів.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним інгібітором тирозин кінази. Термін "інгібітор тирозин кінази" у цій специфікації стосується хімічної речовини, яка інгібує "тирозин кіназу", що передає λ -фосфатну групу АТФ до гідроксильової групи специфічного тирозину в білку. Приклади протипухлинних інгібіторів тирозин кінази включають, але не обмежуються, гефітініб, іматиніб, ерлотиніб, Сутент, Нексавар, Рецентин, АВТ-869, та Акситиніб.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є антитілом чи зв'язаною часткою антитіла, які відзначаються протипухлинною активністю. У деяких варіантах, протипухлинний агент є моноклональним антитілом. Приклади у даній специфікації включають, але не обмежуються, абциксімаб, адаліумаб, алемтузумаб, базіліксімаб, бевацизумаб, цетуксімаб, даклізумаб, екулізумаб, ефалізумаб, ібрітумомаб, тіуксетан, інфліксімаб, муромонаб-CD3, наталізумаб, омалізумаб, палівізумаб, панітумумаб, ранібізумаб, гемтузумаб озогаміцин, рітуксімаб, тосітумомаб, трастузумаб, чи будь-які фрагменти антитіла, притаманні антигенам.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є інтерфероном. Такий інтерферон має протипухлинну активність, та є глікопротеїном, який виробляється та секретується більшістю тваринних клітин на вірусну інфекцію. Він має не тільки ефект, що пригнічує вірусне зростання, але також різні імунні ефекторні механізми, включаючи пригнічення росту клітин (зокрема, пухлинних клітин) та покращення активності природних клітин-кілерів, відповідно позначених як один з видів цитокіну. Приклади протипухлинних інтерферонів включають, але не обмежуються, інтерферон α , інтерферон α -2a, інтерферон α -2b, інтерферон β , інтерферон γ -1a та інтерферон γ -n1.

У деяких варіантах, протипухлинний агент є модифікатором біологічного відгуку. Він зазвичай є родовим терміном для речовин чи ліків для модифікації захисних механізмів живих організмів чи біологічних відгуків, таких як виживання, ріст чи диференціація тканинних клітин, з метою їх спрямування на користь для людини проти пухлини, інфекції чи інших хвороб. Приклади модифікаторів біологічного відгуку включають, але не обмежуються, крестин, лентинан, сізіран, піцибаніл та убенімекс.

У деяких варіантах, протипухлинні агенти включають, але не обмежуються, мітоксантрон, L-аспарагіназа, прокарбазин, дакарбазин, гідроксилкарбамід, пентостатин, третиніон, алефацепт, дарбепоедин альфа, анастрозол, екземестан, бікалутамід, лейпрорелін, флутамід, фулвестрант, пегаптаніб октанатрій, денілейкін діфтітокс, алдеслейкін, тіротропін альфа, триоксид миш'яку, бортезоміб, сарецитабін та гозерелін.

Вищеописані терміни "протипухлинний алкілувальний агент", "протипухлинний антиметаболіт", "протипухлинний антибіотик", "протипухлинний агент рослинного походження", "протипухлинний комплекс платини", "протипухлинна похідна камптотecin", "протипухлинний інгібітор тирозин кінази", "моноклональне антитіло", "інтерферон", "модифікатор біологічного

відгуку" та "інші протипухлинні агенти" є усі відомими та є або наявними у продажу, чи можуть бути виготовлені спеціалістом зі звичайною кваліфікацією у даній галузі у по суті відомі способи, чи добре відомі, чи традиційні способи. Спосіб приготування гефїтінібу описано, наприклад, у патенті США № 5,770,599; спосіб приготування цетуксімабу описано, наприклад, у патенті WO 96/40210; спосіб приготування бевацизумабу описано, наприклад, у патенті WO 94/10202; спосіб приготування оксаліплатину описано, наприклад, у патенті США №№ 5,420,319 та 5,959,133; спосіб приготування гемцитабіну описано, наприклад, у патенті США №№ 5,434,254 та 5,223,608; та спосіб приготування камптотецину описано у патенті США №№ 5,162,532, 5,247,089, 5,191,082, 5,200,524, 5,243,050 та 5,321,140; спосіб приготування іринотекану описано, наприклад, у патенті США № 4,604,463; спосіб приготування Топотекану описано, наприклад, у патенті США № 5,734,056; спосіб приготування темозоломїду описано, наприклад, у патенті JP-B № 4-5029; та спосіб приготування рітуксімабу описано, наприклад, у патенті JP-W № 2-503143.

Вищезгадані протипухлинні алкілувальні агенти є наявним у продажу, де представлені наступними прикладами: N-оксид азотистий іприт виробництва "Mitsubishi Pharma Corp." під назвою Нітрорін (торгова назва); циклофосфамід виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Ендоксан (торгова назва); іфосфамід виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Іфомід (торгова назва); мелфалан виробництва "GlaxoSmithKline Corp." під назвою Алкеран (торгова назва); бусульфан виробництва "Takeda Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Маблін (торгова назва); мітобронітол виробництва "Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Мієброл (торгова назва); карбоквон виробництва "Sankyo Co., Ltd." під назвою Есквінон (торгова назва); тіотепа виробництва "Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Теспамін (торгова назва); ранімуствін виробництва "Mitsubishi Pharma Corp." під назвою Цимерін (торгова назва); німуствін виробництва "Sankyo Co., Ltd." під назвою Нїдран (торгова назва); темозоломїд виробництва "Schering Corp." під назвою Темодар (торгова назва); та кармуствін виробництва "Guilford Pharmaceuticals Inc." під назвою Вафлі Гїадел (торгова назва).

Вищезгадані протипухлинні антиметаболїти є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: метотрексат виробництва "Takeda Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Метотрексат (торгова назва); 6-меркаптопурин рїбозида виробництва "Aventis Corp." під назвою Тїоїнозин (торгова назва); меркаптопурин виробництва "Takeda Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Лейкерин (торгова назва); 5-фторурацил виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою 5-FU (торгова назва); тегафур виробництва "Taiho Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Футрафул (торгова назва); доксифлуридин виробництва "Nippon Roche Co., Ltd." під назвою Фурутулон (торгова назва); кармур виробництва "Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Ямафур (торгова назва); цитарабїн виробництва "Nippon Shinyaku Co., Ltd." під назвою Цїлоцид (торгова назва); цитарабїн окфосфат виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Стразид (торгова назва); еноцїтабїн виробництва "Asahi Kasei Corp." під назвою Санрабїн (торгова назва); S-1 виробництва "Taiho Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою TS-1 (торгова назва); гемцитабїн виробництва "Eli Lilly & Co." під назвою Гемзар (торгова назва); флударабїн виробництва "Nippon Schering Co., Ltd." під назвою Флудара (торгова назва); та пеметрексед двонатрієвий виробництва "Eli Lilly & Co." під назвою Алімта (торгова назва).

Вищезгадані протипухлинні антибіотики є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: актиномїцин D виробництва "Banyu Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Космеген (торгова назва); доксорубїцин виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою адріацїн (торгова назва); даунорубїцин виробництва "Meiji Seika Kaisha Ltd." під назвою Дауномїцин; неокарциностатин виробництва "Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Неокарциностатин (торгова назва); блеоїцин виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Блео (торгова назва); пепромїцин виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Пепро (торгова назва); мітоміцин C виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою Мітоміцин (торгова назва); акларубїцин виробництва "Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Аклацїнон (торгова назва); пірарубїцин виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Пінорубїцин (торгова назва); епірубїцин виробництва "Pharmacia Corp." під назвою Фарморубїцин (торгова назва); зїнонстатїн стїмаламер виробництва "Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Сманкс (торгова назва); їдарубїцин виробництва "Pharmacia Corp." під назвою Ідамїцин (торгова назва); сїролімус виробництва "Wyeth Corp." під назвою Рапамун (торгова назва); та валрубїцин виробництва "Anthra Pharmaceuticals Inc." під назвою Валстар (торгова назва).

Вищезгадані протипухлинні агенти рослинного походження є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: вїнкрістїн виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Онковїн (торгова назва); вїнбластїн виробництва "Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою

Вінбластин (торгова назва); віндезін виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Філдезін (торгова назва); етопозид виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Ластет (торгова назва); собузоксан виробництва "Zenyaku Kogyo Co., Ltd." під назвою Перазолін (торгова назва); доцетаксел виробництва "Aventis Corp." під назвою Таксотер (торгова назва); паклітаксел виробництва "Bristol-Myers Squibb Co." під назвою Таксол (торгова назва); та вінорелбін виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою Навелбін (торгова назва).

Вищезгадані протипухлинні комплекси платини є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: цисплатин виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Ранда (торгова назва); карбоплатин виробництва "Bristol-Myers Squibb Co." під назвою Параплатин (торгова назва); недаплатин виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Акупла (торгова назва); та оксалиплатин виробництва "Sani-Synthelabo Co." під назвою Елоксатин (торгова назва).

Вищезгадані протипухлинні похідні камптотецину є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: іринотекан виробництва "Yakult Honsha Co., Ltd." під назвою Кампто (торгова назва); Топотекан виробництва "GlaxoSmithKline Corp." під назвою Гікамтин (торгова назва); та камптотецин виробництва "Aldrich Хімічн Со., Inc.", США.

Вищезгадані протипухлинні інгібітори тирозин кінази є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: гефітініб виробництва "AstraZeneca Corp." під назвою Іресса (торгова назва); іматиніб виробництва "Novartis AG" під назвою Глівек (торгова назва); та ерлотиніб виробництва "OSI Pharmaceuticals Inc." під назвою Тарцева (торгова назва).

Вищезгадані моноклональні антитіла є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: цетуксімаб виробництва "Bristol-Myers Squibb Co." під назвою Ербітукс (торгова назва); бевацизумаб виробництва "Genentech, Inc." під назвою Авастин (торгова назва); рітуксімаб виробництва "Biogen Idec Inc." під назвою Рітуксан (торгова назва); алемтузумаб виробництва "Berlex Inc." під назвою Кемпас (торгова назва); та трастузумаб виробництва "Chugai Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Герцептин (торгова назва).

Вищезгадані інтерферони є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: інтерферон α виробництва "Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Суміферон (торгова назва); інтерферон α -2a виробництва "Takeda Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Канферон-А (торгова назва); інтерферон α -2b виробництва "Schering-Plough Corp." під назвою Інtron А (торгова назва); інтерферон β виробництва "Mochida Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою IFN.бета. (торгова назва); інтерферон γ -1a виробництва "Shionogi & Co., Ltd." під назвою Імуномакс- γ (торгова назва); та інтерферон γ -n1 виробництва "Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Огамма (торгова назва).

Вищезгадані модифікатори біологічного відгуку є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: крестин виробництва "Sankyo Co., Ltd." під назвою крестин (торгова назва); лентинан виробництва "Aventis Corp." під назвою Лентинан (торгова назва); сізіран виробництва "Kaken Seiyaku Co., Ltd." під назвою Соніфіран (торгова назва); піцибаніл виробництва "Chugai Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Піцибаніл (торгова назва); та убенімекс виробництва "Nippon Kayaku Co., Ltd." під назвою Бестатин (торгова назва).

Вищезгадані інші протипухлинні агенти є наявними у продажу та представлені наступними прикладами: мітоксантрон виробництва "Wyeth Lederle Japan, Ltd." під назвою Новантрон (торгова назва); L-аспарагіназа виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою Лейназа (торгова назва); прокарбазин виробництва "Nippon Roche Co., Ltd." під назвою Натулан (торгова назва); дакарбазин виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd." під назвою Дакарбазин (торгова назва); гідроксилкарбамід виробництва "Bristol-Myers Squibb Co." під назвою Гідреа (торгова назва); пентостатин виробництва "Kagaku Oyobi Kessei Ryoho Kenkyusho" під назвою Корін (торгова назва); третиноїн виробництва "Nippon Roche Co., Ltd." під назвою Везаноїд (торгова назва); алефацепт виробництва "Biogen Idec Inc." під назвою Амеів (торгова назва); дарбепоетин альфа виробництва "Amgen Inc." під назвою Аранесп (торгова назва); анастрозол виробництва "AstraZeneca Corp." під назвою Арімідекс (торгова назва); екземестан виробництва "Pfizer Inc." під назвою Аромазин (торгова назва); бікалутамід виробництва "AstraZeneca Corp." під назвою Казодекс (торгова назва); лейпрорелін виробництва "Takeda Pharmaceutical Co., Ltd." під назвою Лейплін (торгова назва); флутамід виробництва "Schering-Plough Corp." під назвою Еулексін (торгова назва); фулвестрант виробництва "AstraZeneca Corp." під назвою Фаслодекс (торгова назва); пегаптаніб октанатрій виробництва "Gilead Sciences, Inc." під назвою Макуген (торгова назва); денілейкін діфтітокс виробництва "Ligand Pharmaceuticals Inc." під назвою Онтак (торгова назва); алдеслейкін виробництва "Chiron Corp." під назвою Пролейкін (торгова назва); тіротропін альфа виробництва "Genzyme Corp." під назвою Тіроген (торгова назва); триоксид миш'яку виробництва "Клітина Therapeutics, Inc." під назвою Тризенокс (торгова назва).

назва); бортезоміб виробництва "Millennium Pharmaceuticals, Inc." під назвою Велкад (торгова назва); сарецитабін виробництва "Hfmann-La Roche, Ltd." під назвою Кселода (торгова назва); та гозерелін виробництва "AstraZeneca Corp." під назвою Золадекс (торгова назва). Термін "протипухлинний агент", у тому сенсі, в якому використовується у специфікації, включає

- 5 вищеописані протипухлинний алкілувальний агент, протипухлинний антиметаболіт, протипухлинний антибіотик, протипухлинний агент рослинного походження, протипухлинний комплексом платини, протипухлинну похідну камптотецину, протипухлинний інгібітор тирозин кінази, моноклональне антитіло, інтерферон, модифікатор біологічного відгуку, та інші протипухлинні агенти.
- 10 Інші протипухлинні агенти чи протинеопластичні агенти можуть застосовуватися у поєднанні зі сполуками бензопірону. Такі придатні протипухлинні агенти чи протинеопластичні агенти включають, але не обмежуються, 13-цис-Ретиноева кислота, 2-CdA, 2-Хлордеоксиаденозин, 5-Азацилідін, 5-Фторурацил, 5-FU, 6-Меркаптопурин, 6-MP, 6-TG, 6-Тиогуанін, Абраксан, Аккутан, Актиноміцин-D, Адриаміцин, Адруцил, Агрилін, Ала-Корт, Алдеслейкін, Алемтузумаб, АЛІМТА,
- 15 Алітретиноїн, Алкабан-AQ, Алкеран, повністю трансретиноева кислота, Альфа Інтерферон, Альтретамін, Аметоптерін, Амифостин, Аміноглутетимід, Анагрелід, Анандрон, Анастрозол, Арабіносілцитозин, Ара-С, Аранесп, Аредіа, Арімідекс, Аромазин, Арранон, Триоксид миш'яку, Аспарагіназа, АТРА, Авастин, Азацилідін, BCG, BCNU, Бендамустін, Бевацизумаб, Бексаротен, БЕКСАР, Бікалутамід, БИКНУ, Бленоксан, Блеоміцин, Бортезоміб, Бусульфам, Бусульфамекс,
- 20 C225, Кальцій Лейковорин, Кемпас, Камптозар, Камптотекін-11, Сарецитабін, Карак, Карбоплатин, Кармустін, Вафлі Кармустін, Казодекс, CC-5013, CCI-779, CCNU, CDDP, СиіНУ, Церубідін, Цетуксімаб, Хлорамбуцил, Цисплатин, Цитроворум-фактор, Кладрібін, Кортизон, Космеген, CPT-11, Циклофосфамід, Цитадрен, Цитарабін, Цитарабін Ліпозомал, Цитозар-У, Цитоксан, Дакарбазин, Дакоген, Дактиноміцин, Дарбепоедин Альфа, Дазатиніб, Дауноміцин,
- 25 Даунорубіцин, Даунорубіцин Гідрохлорид, Даунорубіцин Ліпозомал, ДауноКсом, Декадрон, Децитабін, Дельта-Кортеф, Дельтазон, Денілейкін Діфтітокс, ДепоЦит™, Дексаметазон, Дексаметазон Ацетат, Дексаметазон фосфат натрію, Дексазон, Дексразоксан, DHAD, DIC, Діюдекс, Доцетаксел, Доксіл, Доксорубіцин, Доксорубіцин Ліпозомал, Дроксія™, DTIC, DTIC-Дом, Дуралон, Ефудекс, Елігард, Елленс, Елоксатин, Елспар, Емцит, Епірубіцин, Епоедин Альфа, Ербітукс, Ерлотиніб, Ервінія L-аспарагіназа, Естрамустин, Етіол, Етопосфос, Етопозид, фосфат Етопозиду, Еулесін, Евіста, Екземестан, Фарестон, Фаслодекс, Фемара, Філграстим, Флоксурідин, Флудара, Флударабін, Флюороплекс, Фторурацил, Фторурацил (крем), Флюоксіместерон, Флутамід, Фолієва кислота, FUDR, Фулвестрант, G-CSF, Гефітиніб, Гемцитабін, Гемтузумаб озогаміцин, Гемзар & Гемзар побічні ефекти - хіміотерапевтичні ліки,
- 35 Глівек, Вафлі Гліадель, GM-CSF, Гозерелін, Гранулоцит - фактор, що стимулює колонії, Гранулоцит фактор, що стимулює колонії макрофагів, Галотестин, Герцептин, Гексадрол, Гексален, Нехаметилмеламін, HMM, Гікамтин, Гідреа, Гідрокорт ацетат, Гідрокортисон, Гідрокортисон фосфат натрію, Гідрокортисон сукцинат натрію, фосфат Гідрокортисону, Гідроксилкарбамід, Ібрітумомаб, Ібрітумомаб Тіуксетан, Ідаміцин, Ідарубіцин, Іфекс , IFN-альфа, Іфосфамід, IL-11, IL-2, Іматиніб мезілат, Імідазол Карбоксамід, Інтерферон альфа, Інтерферон
- 40 Альфа-2b (PEG кон'югат), Інтерлейкін - 2, Інтерлейкін-11, Інtron А (інтерферон альфа-2b), Іпекка, Іринотекан, Ізотретиноїн, Іксабепілон, Іксемпра, Кідролаза (t), Ланакорт, Лапатиніб, L-аспарагіназа, LCR, Леналідомід, Летрозол, Лейковорин, Лейкеран, Лейкін, Лейпролід, Лейпрокрістин, Лейстатин, Ліпозомал Ара-С, Ліквід пред, Ломустин, L-PAM, L-Сарколізин, Лупрон, Лупрон Депот, Матулан, Максідекс, Мехлоретамін, гідрохлорид Мехлоретаміну,
- 45 Медралон, Медрол, Мегас, Мегестрол, ацетат Мегестролу, Мелфалан, Меркаптопурин, Месна, Меснекс, Метотрексат, Метотрексат натрій, Метилпреднізолон, Метікортен, Мітоміцин, Мітоміцин-С, Мітоксантрон, М-Преднізол, МТС, МТХ, Мустарген, Мустін, Мутаміцин, Мілеран, Мілоцел, Мілотарг, Навелбін, Неларабін, Неозар, Ньюласта, Ньюмега, Ньюоген, Нексавар,
- 50 Ніландрон, Нілутамід, Ніпент, азотистий іприт, Новалдекс, Новантрон, Октреотид, Октреотид ацетат, Онкоспар, Онковін, Онтак, Онксал, Определкін, Орапред, Оразон, Оксалиплатин, Паклітаксел, Паклітаксел зі зв'язаним білком, Памідронат, Панітумумаб, Панретин, Параплатин, Педіапред, PEG Інтерферон, Пегаспагаза, Пегфілграстим, PEG-ІНТРОН, PEG-L-аспарагіназа, ПЕМЕТРЕКСЕД, Пентостатин, Фенілаланін мустард, Платінол, Платінол-AQ, Преднізолон,
- 55 Преднізон, Прелон, Прокарбазин, ПРОКРІТ, Пролейкін, Проліфепроспан 20 з Кармустін імплантантом, Пурінетол, Ралоксифен, Ревлімід, Реуматрекс, Рітуксан, Рітуксімаб, Рерон-А (Інтерферон Альфа-2а), Рубекс, гідрохлорид Рубідоміцину, Сандостатин, Сандостатин LAR, Сарграмостім, Солу-Кортеф, Солу-Medrol, Сорафеніб, СПРАЙСЕЛ, STI-571, Стрептозоцин, SU11248, Сунітиніб, Сутент, Тамоксифен, Тарцева, Таргретин, Таксол, Таксотер, Темодар,
- 60 Темозоломід, Темсіролімус, Теніпозид, ТЕСПА, Талідомід, Таломід, ТераЦис, Тиогуанін,

Тиогуанін Таблоїд, Тіофосфоамід, Тіоплекс, Тіотепа, TICE, Топозар, Топотекан, Тореміфен, Торісел, Тосітумомаб, Трастузумаб, Третіноїн, Трексалл™, Тризенокс, TSPA, TYKERB, VCR, Вектібікс, Вектібікс, Велбан, Велкад, Велпезід, Везаноїд, Віадур, Відаза, Вінбластин, Вінбластин сульфат, Вінказар Pfs, Вінкрістин, Вінорелбін, Вінорелбін тартрат, VLB, VM-26, Воріностат, VP-16, Вумон, Кселода, Занозар, Зевалін, Зінекард, Золадекс, Золедроновна кислота, Золінза, Зомета.

Антиметаболіти:

Антиметаболіти є ліками, що впливають на нормальні метаболічні процеси клітин. Оскільки раку клітини швидко відтворюються, втручання у клітинний метаболізм впливає на раку клітини в більшому ступені ніж на клітини господаря. Гемцитабін (4-аміно-1-[3,3-дифтор-4-гідроксил-5-(гідроксилметил) тетрагідруран-2-іл]- 1Н-пірімідин- 2-один; що є у продажу під назвою ГЕМ3АР® виробництва "Eli Lilly and Company") є аналогом нуклеозиду, який взаємодіє з клітинним поділом, блокуючи синтез ДНК, що, таким чином, призводить до некрозу клітин, очевидно через апоптичний механізм. Дозування гемцитабіну має уточнюватися для конкретного пацієнта. Для дорослих, дозування гемцитабіну, що застосовується у поєднанні з агентом платини та інгібітором PARP, буде в межах від близько 100 мг/м² до близько 5000 мг/м², у межах від близько 100 мг/м² до близько 2000 мг/м², у межах від близько 750 до близько 1500 мг/м², від близько 900 до близько 1400 мг/м² чи близько 1250 мг/м². Величини мг/м² стосуються кількості гемцитабін у міліграмах (мг) на одиницю площини поверхні пацієнту у квадратних метрах (м²). Гемцитабін може вводиться шляхом внутрішньовенного (IV) вливання, наприклад, протягом періоду від близько 10 до близько 300 хвилин, від близько 15 до близько 180 хвилин, від близько 20 до близько 60 хвилин чи близько 10 хвилин. Термін "близько" у цьому контексті вказує на звичайне вживання слова "приблизно"; та у деяких варіантах вказує на допуск $\pm 10\%$ чи $\pm 5\%$.

Комплекси платини:

Комплекси платини є фармацевтичними композиціями, що застосовуються для лікування раку, які містять принаймні один платиновий центр у комплексі з принаймні однією органічною групою. Карбоплатин ((SP-4-2)-Діамін[1,1-циклобутандикарбоксилато(2-)-О,О' платина), такий як цисплатин та оксалиплатин, є ДНК алкілувальним агентом. Дозування карбоплатину визначається шляхом розрахунку площини на кривій зміни концентрації плазми крові (AUC) у способи, відомі спеціалістам у галузі хіміотерапії раку, беручи до уваги кліренс креатиніну пацієнта. У деяких варіантах, дозування карбоплатину для комбінованого лікування разом з антиметаболітом (наприклад, гемцитабіном) та інгібітором PARP (наприклад, 4-йодо-3-нітробензамідом) розраховується таким чином, щоб забезпечити AUC близько 0.1-6 мг/мл на хвилину, близько 1-3 мг/мл на хвилину, від близько 1.5 до близько 2.5 мг/мл на хвилину, від близько 1.75 до близько 2.25 мг/мл на хвилину чи близько 2 мг/мл на хвилину (AUC 2, наприклад, є умовним позначенням для 2 мг/мл на хвилину). У деяких варіантах, дозування карбоплатину для комбінованого лікування разом з таксаном (наприклад, паклітакселом чи доцетакселом), та інгібітором PARP (наприклад, 4-йодо-3-нітробензамідом) розраховується таким чином, щоб забезпечити AUC близько 0.1-6 мг/мл на хвилину, близько 1-3 мг/мл на хвилину, від близько 1.5 до близько 2.5 мг/мл на хвилину, від близько 1.75 до близько 2.25 мг/мл на хвилину чи близько 2 мг/мл на хвилину (AUC 2, наприклад, умовним позначенням для 2 мг/мл на хвилину). У деяких варіантах, відповідна доза карбоплатину становить від близько 10 до близько 400 мг/м², наприклад, близько 360 мг/м². Комплекси платини, такі як карбоплатин, зазвичай вводяться внутрішньовенно (IV) протягом періоду від близько 10 до близько 300 хвилин, від близько 30 до близько 180 хвилин, від близько 45 до близько 120 хвилин чи близько 60 хвилин. У цьому контексті, термін "близько" має своє звичне значення "приблизно". У деяких варіантах, близько означає $\pm 10\%$ чи $\pm 5\%$.

Інгібітори топоізомерази

У деяких варіантах, способи відповідно до винаходу можуть включати призначення пацієнтові, хворому на рак молочної залози, ефективної кількості інгібітору PARP у поєднанні з інгібітором топоізомерази, наприклад, іринотеканом чи Топотеканом.

Інгібітори топоізомерази є агентами, створеними для впливу на дію ферментів топоізомерази (топоізомерази I та II), що є ферментами, які контролюють зміни у структурі ДНК шляхом каталізування розриву та з'єднання фосфодиефірної основи ланцюгів ДНК під час нормального клітинного циклу. Топоізомерази набули популярності у якості цілей при лікуванні раку хіміотерапією. Вважається, що інгібітори топоізомерази блокують етап лігування клітинного циклу, генеруючи одноланцюгові та дволанцюгові розриви, що порушують цілісність геному. Введення цих розривів зрештою призводить до апоптозу та некрозу клітин. Інгібітори топоізомерази часто поділяються за типом ферменту, який вони інгібують. Топоізомераза I, тип

топоізомерази, що найчастіше зустрічається в еукаріотах, представлена топотеканом, іринотеканом, луртотеканом та екзатеканом, кожен з яких є наявним у продажу. Топотекан виготовляється "GlaxoSmithKline" під торговою назвою Гікамтим®. Іринотекан виготовляється "Pfizer" під торговою назвою Камптозар®. Луртотекан може бути отриманий як препарат ліпозомал виробництва "Gilead Sciences Inc." Інгібітори топоізомерази мають призначатися в ефективній дозі. У деяких варіантах ефективна доза для лікування людини буде в межах від близько 0.01 до близько 10 мг/м²/на день. Лікування може повторюватися на щоденній, двотижневій, півтижневій, тижневій чи місячній основі. У деяких варіантах, період лікування може супроводжуватися перервою від одного до кількох днів, чи від одного до кількох тижнів. У поєднанні з інгібітором PARP-1, прийом інгібітору PARP-1 та інгібітору топоізомерази може призначатися в один день чи в окремі дні.

Сполуки, що представляють тип II топоізомерази поділяються на два основні класи: топоізомерази отрути, які націлені на комплекс топоізомерази-ДНК, та топоізомерази інгібітори, які розривають каталітичний цикл. Топоізомерази отрути II включають, але не обмежуються, еукаріотичні інгібітори топоізомерази II типу (топо- II): амсакрин, етопозид, фосфат етопозиду, теніпозид та доксорубіцин. Ці препарати належать до протиракових терапевтичних засобів. Приклади інгібіторів топоізомерази включають ICRF-193. Ці інгібітори націлені на N-кінцевий домен АТРази топо- II та перешкоджають обороту топо- II. Структура цієї сполуки, зв'язаної з доменом АТРази, була визначена Класеном (Вісті Національної академії наук, 2004 р.), який показав, що препарат зв'язує у неконкурентний спосіб та обмежує можливості димеризації домену АТРази.

Протиангіогенні агенти

У деяких варіантах, способи відповідно до винаходу можуть включати призначення пацієнтові, хворому на рак молочної залози, ефективної кількості інгібітору PARP у поєднанні з протиангіогенним агентом.

Інгібітор ангіогенезу є речовиною, яка інгібує ангіогенез (ріст нових кровоносних судин). Кожна солідна пухлина (на відміну від лейкемії) має потребу в утворенні кровоносних судин для підтримання її життєздатності при досягненні певного розміру. Пухлини можуть зростати тільки, якщо вони формують нові кровоносні судини. Зазвичай, кровоносні судини не утворюються деінде в тілі дорослої людини, якщо не відбувається активного процесу репарації тканини. Ангіостатичний агент ендостатин та пов'язані хімічні речовини можуть пригнічувати утворення кровоносних судин, перешкоджаючи необмеженому зростанню раку. Дослідження на пацієнтах засвідчило, що пухлина втрачала активність та залишалася такою навіть після припинення лікування ендостатином. Лікування має дуже незначну кількість побічних ефектів, але має дуже обмежену селективність. Інші ангіостатичні агенти, такі як талідомід та природні речовини на рослинній основі активно досліджуються.

Відомі інгібітори включають препарат бевацизумаб (Авастин), який зв'язує судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), пригнічуючи його зв'язування з рецепторами, які сприяють ангіогенезу. Інші протиангіогенні агенти включають, але не обмежуються, карбоксиамідотриазол, TNF-470, CM101, IFN-альфа, IL-12, тромбоцитарний фактор-4, сурамін, SU5416, тромбоспондин, ангіостатичні стероїди + гепарин, інгібіторний фактор ангіогенезу хрящового походження, інгібітори матричної металопротеїнази, ангіостатин, ендостатин, 2-метоксиестрадіол, текогалан, тромбоспондин, пролактин, $\alpha_v\beta_3$ інгібітори та ліномід.

Her-2 націлена терапія

У деяких варіантах, способи відповідно до винаходу можуть включати призначення пацієнтові, хворому на HER2 позитивний рак молочної залози, ефективної кількості інгібітору PARP у поєднанні з Герцептином.

Герцептин (трастузумаб) є націленим терапевтичним засобом для застосування на ранній стадії HER2-позитивного раку молочної залози. Герцептин схвалено для ад'ювантного лікування HER2-гіперекспресивного, з позитивними лімфовузлами чи негативними лімфовузлами (ER/PR-негативним чи тільки однією ознакою високого ризику) раку молочної залози. Герцептин може застосовуватися у декілька різних способів: як частина курсу лікування, що включає доксорубіцин, циклофосфамід, та або паклітаксел, або доцетаксел; з доцетакселом та карбоплатином; чи як окремий агент, що застосовується після комплексної терапії на основі антрацикліну. Герцептин у поєднанні з паклітакселом схвалено для першочергового лікування HER2-гіперекспресивного метастатичного раку молочної залози. Герцептин у якості окремого агенту схвалено для лікування HER2-гіперекспресивного раку молочної залози у пацієнтів, які отримали один чи більше курсів хіміотерапії метастатичної хвороби.

Лапатиніб чи лапатиніб дитосілат є перорально активним хіміотерапевтичним препаратом для лікування солідних пухлин, таких як рак молочної залози. Під час розробки він був відомий

як дрібна молекула GW572016. Пацієнтам, які відповідали специфічним індикативним критеріям, могли призначати лапатиніб у якості компоненту комплексної терапії раку молочної залози. Фармакологічно, лапатиніб є інгібітором подвійної тирозин кінази, який перешкоджає клітинним сигналам, що спричиняють рак. Лапатиніб застосовується для лікування раку

Гормональна терапія

У деяких варіантах, способи відповідно до винаходу можуть включати призначення пацієнтові, хворому на рак молочної залози, ефективної кількості інгібітору PARP у поєднанні з гормональною терапією.

Існує ряд гормонів, які можуть приєднуватися до ракових клітин та можуть впливати на їх здатність до розмноження. Ціль гормональної терапії полягає у приєднанні, блокуванні чи усуненні гормонів. При раку молочної залози, жіночі гормони естроген та прогестерон можуть стимулювати ріст деяких клітин раку молочної залози. Таким чином, щодо цих пацієнтів застосовується гормональна терапія для блокування естрогену, що виникає в організмі природним шляхом, та для перешкоджання росту раку. Існує два види гормональної терапії раку молочної залози: препарати, що інгібують естроген та прогестерон з метою запобігання стимулюванню росту клітин раку молочної залози, та препарати чи хірургія для зупинки продукування гормонів яєчником.

Препарати загальної гормональної терапії, що застосовуються для лікування раку молочної залози, включають, але не обмежуються, Тамоксифен, Фарестон, Арімідекс, Аромазин, Фемара та Золадекс.

Тамоксифен - антагоніст гормону

Тамоксифен (наявний у продажу під назвою Нолвадекс) зменшує шанси рецидиву раку молочної залози на деяких ранніх стадіях та може запобігти розвитку раку в молочній залозі, що не була уражена. Тамоксифен також уповільнює чи зупиняє ріст ракових клітин, наявних в організмі. Крім того, тамоксифен може являти собою альтернативу обережного очікування чи профілактичної (превентивної) мастектомії у жінок з високим ризиком розвитку раку молочної залози. Тамоксифен належить до виду препаратів, які називають селективним модулятором естрогенових рецепторів (SERM). У молочній залозі він функціонує як антиестроген. Естроген стимулює ріст клітин раку молочної залози, а тамоксифен блокує приєднання естрогену до естрогенових рецепторів у цих клітинах. Діючи у такий спосіб, вважається, що ріст клітин раку молочної залози буде зупинено. Тамоксифен часто застосовується разом з хіміотерапією та іншими видами лікування раку молочної залози. Він розглядається як один з можливих варіантів у наступних випадках: лікування внутрішньопротокової карциноми in situ (DCIS) разом з реконструктивною хірургією молочної залози чи мастектомією; ад'ювантне лікування лобулярної карциноми in situ (LCIS) з метою зменшення ризику розвитку прогресуючого раку молочної залози; ад'ювантне лікування метастатичного раку молочної залози у чоловіків та жінок, хворих на рак, позитивний щодо естрогенового рецептору; лікування рецидиву раку молочної залози; профілактика раку молочної залози у жінок з високим ризиком розвитку раку молочної залози.

Стероїдний та нестероїдний інгібітор ароматази

Інгібітори ароматази (AI) належать до класу препаратів, які застосовуються для лікування раку молочної залози та раку яєчника у жінок постменопаузального віку, що блокують фермент ароматази. Інгібітори ароматази зменшують кількість естрогену у жінок постменопаузального віку, які мають рак молочної залози, позитивний щодо рецепторів гормону. За умови зниження естрогену в організмі, рецептори гормону отримують меншу кількість сигналів росту, а розвиток раку може бути уповільнений чи зупинений.

Медичні препарати інгібітору ароматази включають Арімідекс (хімічна назва: анастрозол), Аромазин (хімічна назва: екземестан), та Фемару (хімічна назва: летрозол). Кожен з яких приймається по таблетці раз на день, до п'яти років. Але жінки з прогресуючою (метастатичною) хворобою, продовжують приймати препарат до тих пір, доки він добре допомагає.

AI класифікуються за двома типами: необоротні стероїдні інгібітори, такі як екземестан, що утворюють постійний зв'язок з комплексом ферменту ароматази; та нестероїдні інгібітори (такі як анастрозол, летрозол), що інгібують фермент шляхом оборотної конкуренції.

Фулвестрант, також відомий як ICI 182,780, та "Фаслодекс" застосовуються для медикаментозного лікування метастатичного раку молочної залози, що є позитивним на рецептор гормону, у жінок постменопаузального віку, у яких хвороба прогресує після протистрогенової терапії. Це антагоніст естрогенового рецептору без ефекту агоніста, який діє

як шляхом понижуючої регуляції, так і шляхом деградування естрогенового рецептору. Препарат вводиться шляхом разової місячної ін'єкції.

Націлена терапія

У деяких варіантах, способи відповідно до винаходу можуть включати призначення пацієнтові, хворому на рак молочної залози, ефективної кількості інгібітору PARP у поєднанні з інгібітором, націленим на рецептор фактору росту, включаючи, але не обмежуючись, рецептор епідермального фактору росту (EGFR) та рецептор інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R).

EGFR є гіперекспресивним у клітинах певних типів людських карцином, включаючи, але не обмежуючись, рак легенів та рак молочної залози. Високопроліферовані, інвазивні клітини раку молочної залози часто відзначаються патологічно високими рівнями EGFR, що як відомо контролюють як поділ клітин, так і їх міграцію. Інтерес до EGFR також посилюється наявністю та схваленням FDA (Управління контролю за продуктами і ліками (США)) специфічних інгібіторів тирозин кінази EGFR, наприклад, Гефітінібу. Інгібування EGFR є важливим протираковим лікуванням. Приклади інгібіторів EGFR включають, але не обмежуються, цетуксімаб, який є а химерним моноклональним антитілом, що вводиться шляхом внутрішньовенної ін'єкції для лікування раку, включаючи, але не обмежуючись, метастатичний колоректальний рак та рак голови та шиї. Панітумімаб є іншим прикладом інгібітору EGFR. Він є гуманізованим моноклональним антитілом проти EGFR. Панітумімаб проявив себе корисним та кращим за підтримуюче лікування, коли застосовується окремо у пацієнтів з прогресуючим раком товстої кишки та був схвалений FDA для такого застосування.

Активация рецептору інсуліноподібного фактору росту (IGF1R) 1 типу стимулює проліферацію та інгібує апоптоз у різних типах клітин. У трансгенних мишей, у яких проявлявся конститутивно-активний IGF1R чи IGF-1, розвивалися пухлини молочної залози та спостерігалися підвищені рівні IGF1R на стадії первинного раку молочної залози (Янчко та інші. Дослідження раку молочної залози 2006 р.). Також зазначалося, що рецептор інсуліноподібного фактору росту I (IGF1R) та HER2 відзначаються важливими сигнальними взаємодіями при раку молочної залози. Специфічні інгібітори одного з цих рецепторів можуть перехресно інгібувати активність інших. Націленість на обидва рецептори забезпечує максимальне інгібування їх позаклітинної сигнально регульованої та направленої вниз кінази 1/2 та сигнальних шляхів АКТ. Таким чином, подібні комбінації препаратів можуть бути клінічно корисними та можуть мати користь навіть у пухлинах, в яких препарати окремо є неактивними, та представлені наступними прикладами дії комбінації інгібіторів HER2/IGF1R на HER2 негіперекспресивні клітини MCF7 (Чакраборті АК, та інші, Дослідження раку, 1 березня 2008 р.; 68(5):1538-45). Одним з прикладів інгібітору IGF1R є CP-751871. CP-751871 є людським моноклональним антитілом, що селективно зв'язується з IGF1R, перешкоджаючи зв'язуванню IGF1 з рецептором та подальшому автофосфорилюванню рецептору. Інгібування автофосфорилювання IGF1R може призводити до скорочення експресії рецептору у клітинах пухлини, в яких проявляється IGF1R, до скорочення протиапоптичного ефекту IGF та інгібування росту пухлини. IGF1R є рецептором з тирозин кіназою, що проявляється у більшості пухлинних клітин, та є задіяним у мітогенезі, ангиогенезі та виживанні пухлинних клітин.

Шлях PI3K/mTOR

Дерегуляція шляху фосфатиділінозитол-3-кінази (PI3K) є поширеним явищем у раку людини, або шляхом інактивації супресор фосфатази пухлини та тензин гомолога, видаленого з хромосоми 10, або шляхом активації мутації p110-α. Ці мутації "гарячих точок" призводять до онкогенної активності ферменту та сприяють терапевтичному опору трастузумабу анти-HER2 антитіла. Шлях PI3K є, таким чином, привабливою ціллю для терапії раку. NVP-BEZ235, подвійний інгібітор PI3K та націлений на ссавців рапаміцин (mTOR) засвідчили інгібування активації направлених униз ефекторів Akt, S6 рибозомал білку та 4EBP1 у клітинах раку молочної залози. NVP-BEZ235 інгібує вісь PI3K/mTOR та призводить до протипроліферативної та протипухлинної активності у ракових клітинах як з немутуванням, так і з мутуванням p110-α (Біолетта Серра, та інші. Дослідження раку 68, 8022-8030, 1 жовтня 2008 р.).

Інгібітори Hsp90

Ці препарати націлені на білки теплового шоку 90 (hsp90). Hsp90 належать до одного з класів білків-шаперонів, звичайною функцією яких є допомога іншим білкам у набутті та підтримці форми, необхідної для цих білків, щоб виконувати свої функції. Шаперони функціонують, будучи у фізичному контакті з іншими білками. Hsp90 також може забезпечити виживання ракових клітин та навіть їх буйне розростання, незважаючи на генетичні дефекти, які зазвичай спричиняють відмирання таких клітин. Таким чином, блокування функції HSP90 та пов'язаних білків-шаперонів може спричиняти відмирання ракових клітини, особливо якщо функція блокування шаперонів комбінується з іншими стратегіями з метою блокування

виживання ракових клітин.

Інгібітори тубуліну

Тубуліни є білками, які формують мікротрубочки, що є ключовими компонентами клітинного цитоскелету (структурної мережі). Мікротрубочки потрібні для поділу клітин (мітозу), структури клітини, транспорту, сигналізації та рухливості. Враховуючи їх першочергове значення для мітозу, мікротрубочки стали важливою ціллю для протиракових препаратів - які часто визначаються як антимиотичні препарати, інгібітори тубуліну та агенти, націлені на мікротрубочки. Ці сполуки зв'язуються з тубуліном у мікротрубочках та перешкоджають проліферації ракових клітин, шляхом втручання у формування мікротрубочок, що потрібні для поділу клітин. Таке втручання блокує послідовність клітинного циклу, яка веде до апоптозу.

Інгібітори апоптозу

Інгібітори апоптозу (IAP) належать до родини функціонально та структурно пов'язаних білків, спочатку охарактеризованих у Бакуловірусі, які виконують роль ендогенних інгібіторів апоптозу. Родина людських IAP складається з принаймні 6 членів, а гомологи IAP були ідентифіковані у чисельних організмів. 10058-F4 є с-Мус інгібітором, який спричиняє зупинку клітинного циклу та апоптозу. Він є проникаючим у клітину тіазолідіномом, який зокрема інгібує с-Мус - Мах взаємодію та перешкоджає трансактивації с-Мус націленої генної експресії. 10058-F4 інгібує ріст клітин пухлини у с-Мус-залежний спосіб як *in vitro*, так і *in vivo*. BI-6C9 є tBid інгібітором та протиапоптичним. GNF-2 належить до нового класу Bcr-abl інгібіторів. GNF-2 має властивості до зв'язування з мірістоїл-зв'язуючою кишенею, алостеричною ділянкою, яка знаходиться на відстані від активної ділянки, що стабілізує неактивну форму кінази. Він інгібує Bcr-abl фосфорилляцію з IC₅₀ 267 nM, але не інгібує панель 63 інших кіназ, включаючи природжений с-Abl, та відзначається повною відсутністю токсичності щодо клітин, які не проявляють Bcr-Abl. GNF-2 засвідчує значний потенціал для нового класу інгібіторів стосовно дослідження активності Bcr-abl та лікування резистивної хронічної мієлогенної лейкемії (CML), що спричинена Bcr-Abl онкопротеїном. Піфітрин-α є оборотним інгібітором p53-опосередкованого апоптозу та p53-залежної генної транскрипції, таких як циклін G, p21/waf1, та mdm2 експресія. Піфітрин-α покращує виживання клітин після генотоксичного стресу, такого як УФ опромінення та лікування цитотоксичними сполуками, включаючи доксорубіцин, етопоксид, паклітаксел та цитозин-β-D-арабінуранозид. Піфітрин-α захищає мишей від летального γ-опромінення усього організму без підвищення захворюваності на рак.

Інгібітори PARP:

У деяких варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи HER2, шляхом призначення суб'єктові, який цього потребує, принаймні одного інгібітору PARP. У інших варіантах, даний винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози шляхом призначення суб'єктові, який цього потребує, принаймні одного інгібітору PARP у поєднанні з принаймні одним протипухлинним агентом, описаним у цій специфікації.

Не маючи на увазі обмеження будь-яким конкретним механізмом дії, сполуки, описані у цій специфікації, вважаються такими, що мають протираку властивості завдяки модуляції активності полі- (ADP-рібози) полімерази (PARP). Цей механізм дії стосується здатності інгібіторів PARP зв'язувати PARP та зменшувати її активність. PARP каталізує конверсію β-нікотинамід аденін динуклеотиду (NAD⁺) у нікотинамід та полі-ADP-рібозу (PAR). Як полі (ADP-рібоза), так і PARP зв'язуються з регулюванням транскрипції, проліферацією клітин, геномною стабільністю та канцерогенезом (Бушар В.Ж. та інші Експериментальна Гематологія, Том 31, номер 6, червень 2003 р., стор. 446-454(9); Герцег З.; Ванг З.-К. Дослідження мутації / Основи та молекулярні механізми Мутагенезу, Том 477, Номер 1, 2 червень 2001, стор. 97-110(14)). Полі(ADP-рібоза) полімераза 1 (PARP1) є ключовою молекулою у репарації одноланцюгових розривів ДНК (SSB) (Де Мурсія Ж, та інші 1997, Вісник Національної академії наук США 94:7303-7307; Шрайбер В, Данцер Ф, Аме ЖК, Де Мурсія Ж (2006) Національний вісник з молекулярної клітинної біології 7:517-528; Ванг ЗО, та інші (1997) Генні дослідження, 11:2347-2358). Нокаут репарації SSB шляхом інгібування функції PARP1 стимулює дволанцюгові розриви ДНК (DSB), що може запускати синтетичну летальність ракових клітин з дефектною гомологічно-направленою репарацією DSB (Брайант ХЕ, та інші (2005) Природа 434:913-917; Фармер Х, та інші (2005) Природа 434:917-921).

BRCA1 та BRCA2 діють як невід'ємний компонент механіки гомологічної рекомбінації (HR) (Народ СА, Фоулкес ВД (2004) Національний вісник з раку 4:665-676; Гудмундсдотір К, Ашворт А (2006) Онкоген 25:5864-5874).

Клітини, що є дефектними на BRCA1 чи BRCA2, мають дефект репарації дволанцюгових розривів (DSB) механізмом гомологічної рекомбінації (HR) шляхом генної конверсії (Фармер Х,

та інші (2005) Природа 434:917-921; Народ СА, Фоулкес ВД (2004) Національний вісник з раку 4:665-676; Гудмундсдотір К, Ашворт А (2006) Онкоген 25:5864-5874; Хелледей Т, та інші (2008) Національний вісник з раку 8:193-204). Дефіцит або на білки BRCA1, або BRCA2, що є вразливими до раку молочної залози, спричиняє глибоку клітинну чутливість до інгібування активності полі(ADP-рібоза) полімерази (PARP), що призводить до зупинки клітинного циклу та апоптозу. Відзначалося, що критична роль BRCA1 та BRCA2 у репарації дволанцюгових розривів шляхом гомологічної рекомбінації (HR) є причиною, що лежить в основі цієї чутливості, а дефіцит RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, NBS1, ATR, ATM, CHK1, CHK2, FANCD2, FANCA чи FANCC спричиняє таку чутливість (МакКабе Н. та інші "Дефіцит репарації пошкодження ДНК шляхом гомологічної рекомбінації та чутливість до інгібування полі(ADP-рібоза) полімерази", Дослідження раку 2006 р., том 66,8109-8115). Пропонувалося, що інгібування PARP1 може розглядатися як спеціальна терапія раку з дефектами у BRCA1/2 чи інших компонентів шляху HR (Хелледей Т, та інші (2008) Національний вісник з раку 8:193-204). Тричі негативні пухлини становлять 15 % від усього раку молочної залози та часто містять у собі дефекти репарації дволанцюгових розривів ДНК шляхом гомологічної рекомбінації (HR), такі як дисфункція BRCA1 (Роттенберг С, та інші, Вісник Національної академії наук США, 4 листопада 2008 р.; 105(44):17079-84).

Інгібування активності молекули PARP включає зниження активності цих молекул. Термін "інгібує" та його граматичні дієвідміни, такі як "інгібуючий" не має на меті вимагати повного зниження активності PARP. У деяких варіантах, таке зниження становить принаймні близько 50 %, принаймні близько 75 %, принаймні близько 90 %, чи принаймні близько 95 % від активності молекули за відсутності інгібуючого ефекту, наприклад, за відсутності інгібітору, такого як сполука нітробензаміду відповідно до винаходу. У деяких варіантах, інгібування стосується зниження активності, що піддається спостереганню чи вимірюванню. У лікуванні за певними сценаріями, інгібування є достатнім для спричинення терапевтичної та/чи профілактичної користі стосовно стану, відносно якого застосовується лікування. Фраза "не інгібує" та її граматичні дієвідміни не потребують повної відсутності ефекту активності. Наприклад, вона стосується ситуацій, коли спостерігається менше ніж близько 20 %, менше ніж близько 10 %, та переважно менше ніж близько 5 % скорочення активності PARP у присутності інгібітору, такого як сполука нітробензаміду відповідно до винаходу.

Полі (ADP-рібоза) полімераза (PARP) є необхідним ферментом у репарації ДНК, таким чином, відіграючи потенціальну роль в опорі хіміотерапії. Націленість на PARP потенційно вважається такою, що перериває репарацію ДНК, таким чином, покращуючи таксан опосередковану, антиметаболіт опосередковану, інгібітор топоізомерази опосередковану та інгібітор рецептору фактору росту, наприклад, інгібітор IGF1R опосередковану, та/чи комплекс платини опосередковану реплікацію та/чи репарацію ДНК у ракових клітинах. Інгібітори PARP також можуть бути дуже активними проти раку молочної залози з порушенням функції BRCA 1 та BRCA2, чи у пацієнтів з іншими дефектами шляху репарації ДНК. ER, PR, HER2-негативний первинний рак молочної залози демонструє підвищену функціональну активність PARP. Цей підтип раку молочної залози має у 9 разів підвищений ризик мутації BRCA-1 та може мати додаткові дефекти у шляху репарації ДНК при анемії Фанконі.

4-йодо-3-нітробензамід (BA) є невеликою молекулою, що діє на клітини пухлини без виявлення токсичних ефектів у нормальних клітинах. Вважається, що BA досягає свого протинеопластичного ефекту шляхом інгібування PARP. BA є дуже ліпофільним та швидко поширюється у тканинах, включаючи мозок та цереброспінальну рідину (CSF). Він діє активно проти широкого діапазону ракових клітин *in vitro*, включаючи проти клітинних ліній з опором дії ліків. Спеціалісту у даній галузі визнає, що BA може вводитися у будь-якій фармацевтично прийнятній формі, наприклад, фармацевтично прийнятній формі солі, сольвату чи комплексу. Крім того, BA є здатним до таутомеризування у розчині, при цьому таутомерична форма BA також вважається такою, що підпадає під термін BA (чи еквівалент 4-йодо-3-нітробензаміду), разом із солями, сольватами чи комплексами. У деяких варіантах, BA може призначатися у поєднанні з циклодекстрином, таким як гідроксилпропілбетациклодекстрин. Проте, спеціаліст даної галузі визнає, що інші активні та неактивні агенти можуть комбінуватися з BA; та наведення BA, якщо інше не зазначене, включає усі його фармацевтично прийнятні форми.

Базально-подібний рак молочної залози має високу схильність до метастазування у мозок; а BA є відомим як такий, що перетинає гемоенцефалітичний бар'єр. Не прив'язуючись до якоїсь конкретної теорії, вважається, що BA досягає свого протинеопластичного ефекту, інгібуючи функцію PARP. У деяких варіантах, BA може застосовуватися у лікуванні тричі негативних метастатичних пухлин молочної залози. У деяких варіантах, BA може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози, у яких принаймні один з ER, PR та Her2 є негативним. У

деяких варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози, у яких принаймні два ER, PR та Her2 є негативними, наприклад, ER-негативний, PR-негативний та Her-2 позитивний; чи ER-позитивний, PR-негативний та Her-2 негативний; чи ER-негативний, PR-позитивний та Her-2 негативний.

5 У деяких варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з протипухлинним агентом. У деяких варіантах, протипухлинний агент є протипухлинним алкілювальним агентом, протипухлинним антиметаболітом, протипухлинними антибіотиками, протипухлинним агентом рослинного походження, протипухлинним комплексом платини, протипухлинною похідною камптотецину, протипухлинним інгібітором тирозин кінрази, 10 моноклональним антитілом, інтерфероном, модифікатором біологічного відгуку, гормональним протипухлинним агентом, протипухлинним вірусним агентом, інгібітором ангіогенезу, диференціюючим агентом чи іншим агентом, який відзначається протипухлинною активністю, чи їх фармацевтично прийнятною сіллю. У інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з антиметаболітом, таким як гемцитабін, та комплексом 15 платини, таким як карбоплатин. У ще інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні метастатичних пухлин молочної залози у поєднанні з таксаном, таким як паклітаксел, та комплексом платини, таким як карбоплатин. У інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з антиметаболітом, таким як гемцитабін, та комплексом платини, таким як карбоплатин. У ще інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні метастатичних пухлин молочної залози у поєднанні з таксаном, таким як паклітаксел, та комплексом платини, таким як карбоплатин. У інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з протипухлинним агентом. У ще інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з інгібітором топоізомерази, таким як іринотекан чи топотекан. У інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з гормональною терапією. У 25 ще інших варіантах, ВА може застосовуватися у лікуванні пухлин молочної залози у поєднанні з інгібітором рецептору фактору росту, включаючи, але не обмежуючись, інгібітори EGFR чи IGF1R. У деяких варіантах, рак молочної залози є метастатичним тричі негативним раком молочної залози. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи Her-2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні двох з ER, PR чи Her-2. У інших варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи Her-2, та позитивним щодо принаймні одного з ER, PR чи Her-2. У деяких варіантах, рак молочної залози є негативним щодо принаймні двох з ER, PR чи Her2, наприклад, ER-негативним, PR-негативним та Her-2 позитивним; чи ER-позитивним, PR-негативним та Her-2 негативним; чи ER-негативним, PR-позитивним та Her-2 негативним. 35

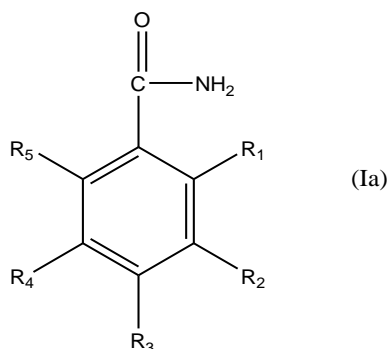
Дозування інгібітору PARP може змінюватися залежно від віку, зросту, ваги, загального стану пацієнта, тощо. У деяких варіантах, дозування ВА є у межах від близько 1 мг/кг до близько 100 мг/кг, від близько 2 мг/кг до близько 50 мг/кг, близько 2 мг/кг, близько 4 мг/кг, близько 6 мг/кг, 40 близько 8 мг/кг, близько 10 мг/кг, близько 12 мг/кг, близько 15 мг/кг, близько 20 мг/кг, близько 25 мг/кг, близько 30 мг/кг, близько 35 мг/кг, близько 40 мг/кг, близько 50 мг/кг, близько 60 мг/кг, близько 75 мг/кг, близько 90 мг/кг, від близько 1 до близько 25 мг/кг, від близько 2 до близько 70 мг/кг, від близько 4 до близько 100 мг, від близько 4 до близько 25 мг/кг, від близько 4 до близько 20 мг/кг, від близько 50 до близько 100 мг/кг чи від близько 25 до близько 75 мг/кг. ВА може вводитися внутрішньовенно, наприклад шляхом вливання IV протягом від близько 10 до 45 близько 300 хвилин, від близько 30 до близько 180 хвилин, від близько 45 до близько 120 хвилин чи близько 60 хвилин (тобто, близько 1 години). У деяких варіантах, ВА може вводитися альтернативно перорально. У цьому контексті, термін "близько" має звичне значення "приблизно". У деяких варіантах, близько означає $\pm 10\%$ чи $\pm 5\%$.

Синтез ВА (4-йодо-3-нітробензамід) описано у патенті Сполучених Штатів № 5,464,871, що 50 включено у повному об'ємі до цієї специфікації шляхом посилання. ВА може бути приготовано у концентраціях 10 мг/мл та може бути упаковано у зручній формі, наприклад у 10 мл флаконах.

Метаболіти ВА:

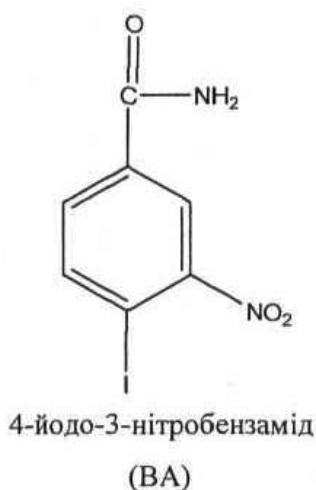
У тому значенні, в якому вживається у даній специфікації, "ВА" означає 4-йодо-3-нітробензамід; "BNO" означає 4-йодо-3-нітрособензамід; "BNHON" означає 4-йодо-3-гідроксиламінобензамід. 55

Сполуки-попередники, корисні для даного винаходу мають Формулу (Ia)

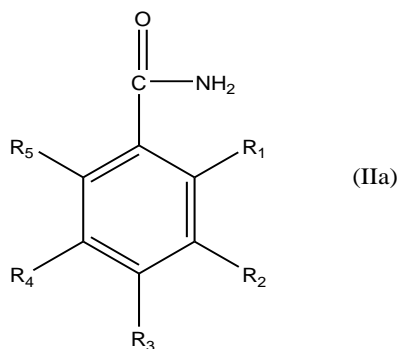


де R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 незалежно обрані серед групи, що складається з водню, гідроксилу, аміно-, нітро-, йодо-, (C_1 - C_6) алкілу, (C_1 - C_6) алкоксилу, (C_3 - C_7) циклоалкілу та фенілу, де
 5 принаймні два з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди воднем, принаймні один з п'яти замісників є завжди нітро-, та принаймні один з замісників, розміщених суміжно до нітро-, є завжди йодо-, та їх фармацевтично прийнятних солей, сольватів, ізомерів, таутомерів, метаболітів, аналогів чи проліків. R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 також можуть бути галоїдом, таким як хлор, фтор, чи бром- замісники.

10 Сполукою-попередником, якій надається перевага, формули Ia є:



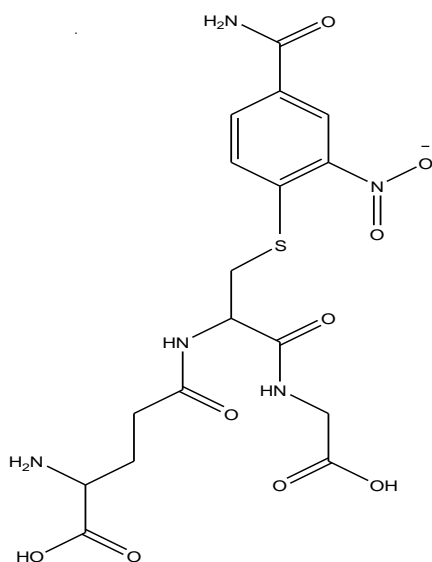
Деякі метаболіти, що є корисними для даного винаходу, мають Формулу (IIa):



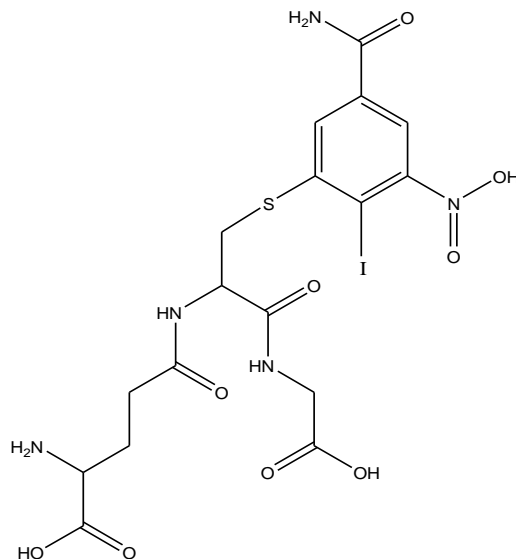
де або: (1) принаймні один із замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди замісником, що містить сірку, та решта замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 незалежно обрані серед групи, що складається з водню, гідроксилу, аміно-, нітро-, йодо-, бром-, фтор-, хлор-, (C_1 - C_6) алкілу, (C_1 - C_6) алкоксилу, (C_3 - C_7) циклоалкілу та фенілу, де принаймні два з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди воднем; чи (2) принаймні один з замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 не є замісником, що містить сірку, та принаймні один з п'яти замісників R_1 , R_2 , R_3 , R_4 та R_5 є завжди йодо-, та де зазначений йодо- є завжди суміжним з групою R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , чи R_5 , що є або нітро-, нітрозо-, гідроксиламіновою,

- гідроксиловою чи аміною групою; та їх фармацевтично прийнятною сіллю, сольватами, ізомерами, таутомерами, метаболітами, аналогами чи проліками. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R₁, R₂, R₃, R₄ чи R₅, що є нітрито-, гідроксиламіною, гідроксиловою чи аміною групою. У деяких варіантах, сполуки (2) є такими, що йодова група є завжди суміжною з групою R₁, R₂, R₃, R₄ чи R₅, що є нітрито-, гідроксиламіною чи аміною групою.

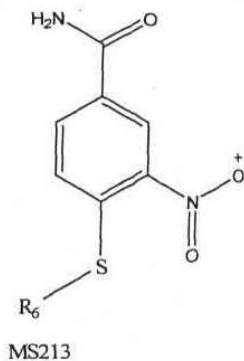
Наступні композиції є сполуками метаболіту, яким надається перевага, кожна з яких представлена хімічною формулою:



MS472

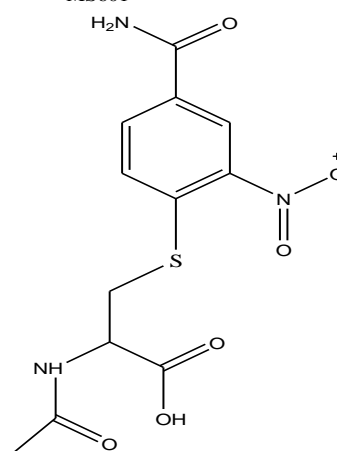


MS601

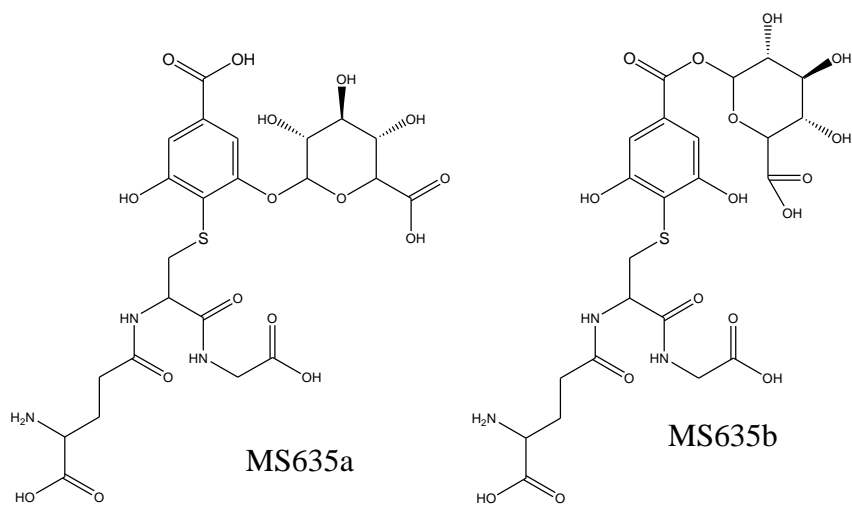
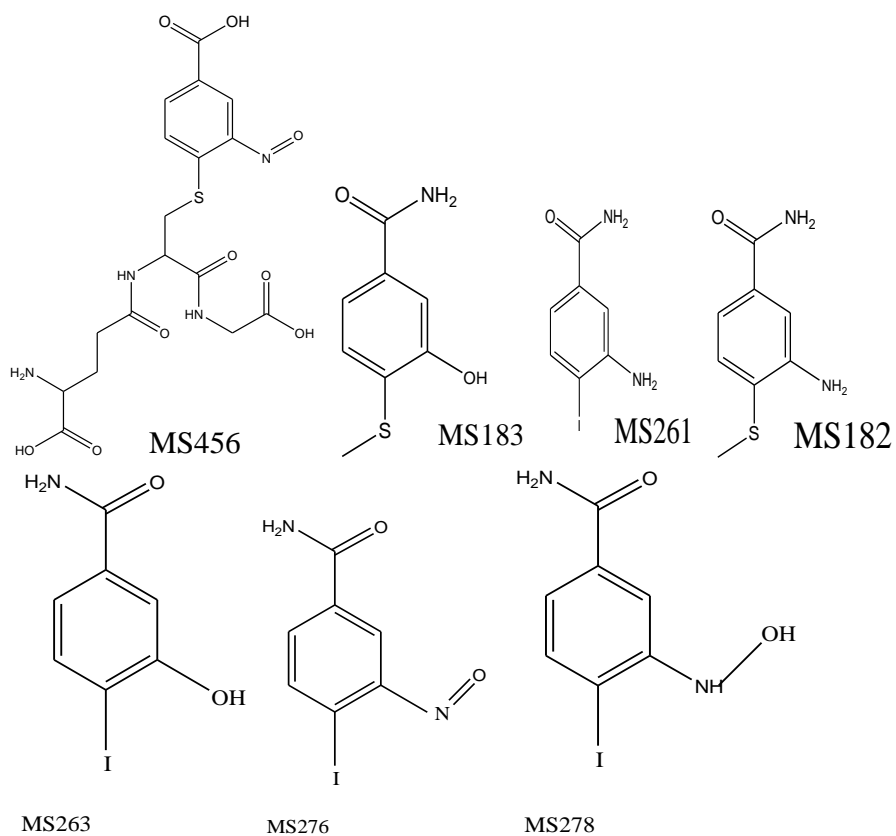


MS213

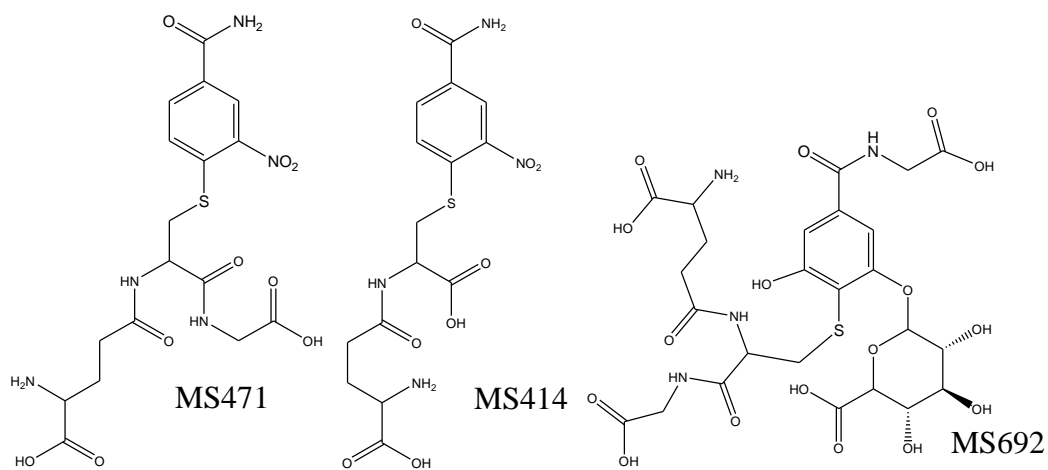
R₆ обрано серед групи, що складається з водню, алкілу (C₁-C₈), алкоксилу (C₁-C₈), ізохінолінонів, індолів, тіазолу, оксазолу, оксадіазолу, тіфену чи фенілу.



MS328

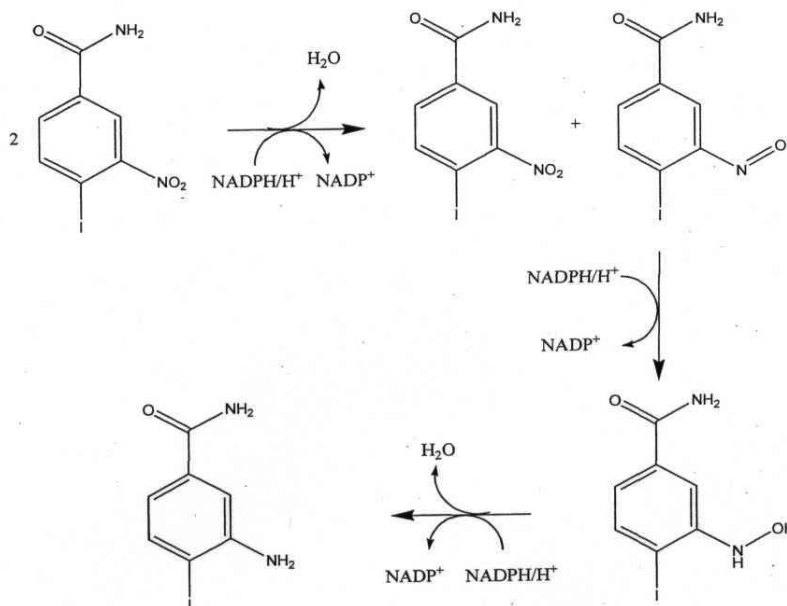


5



Не обмежуючись якимось одним конкретним механізмом, наступне передбачає приклад метаболізму MS292 шляхом механізму сполучення нітроредуктази чи глутатіону:

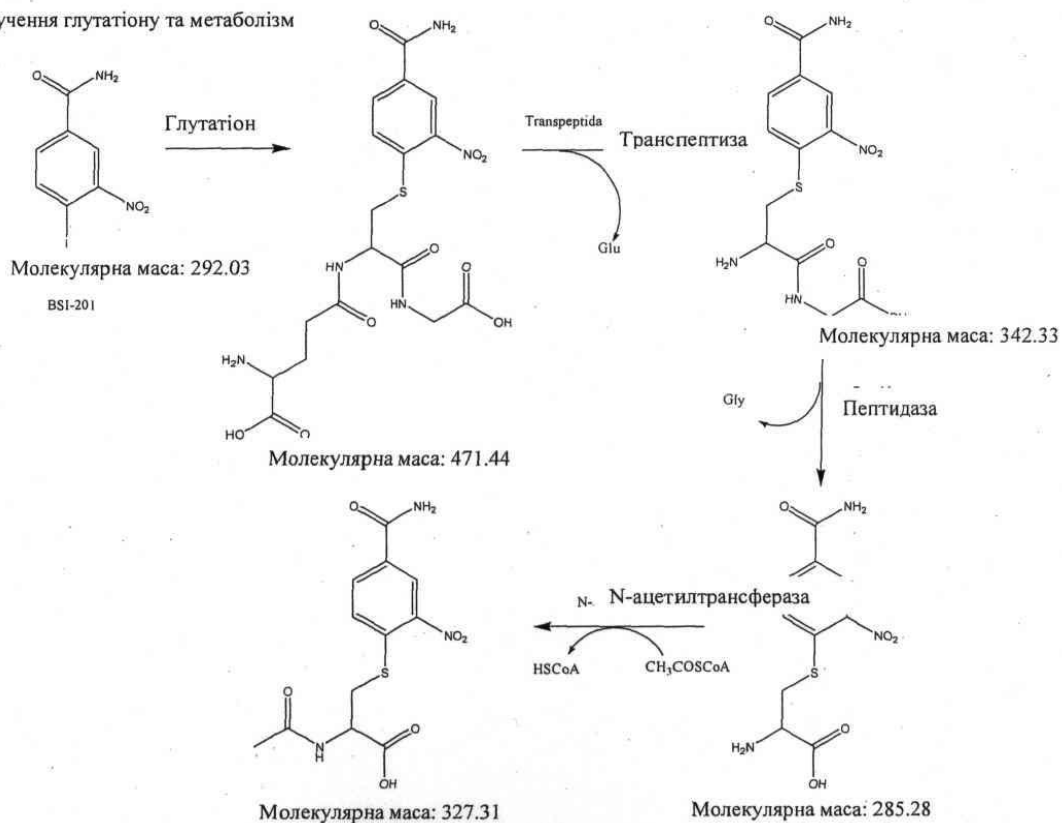
Механізм нітроредуктази anism



5

Сполучення глутатіону та метаболізм ВА:

Сполучення глутатіону та метаболізм



10

Даний винахід передбачає застосування вищезазначених сполук метаболіту нітробензаміду для лікування раку молочної залози, включаючи рак молочної залози, що є негативним щодо

одного чи більше ER, PR та/чи HER2.

Зазначалося, що сполуки метаболіту нітробензаміду мають селективну цитотоксичність проти злоякісних ракових клітин, але не проти доброякісних ракових клітин. Дивіться Райс та інші, Вісник Національної академії наук США 89:7703-7707 (1992), що включено у повному
5 обсязі до цієї специфікації. У одному варіанті, сполуки метаболіту нітробензаміду, що використовуються у способах даного винаходу, можуть проявляти більше селективної токсичності щодо пухлинних клітин, ніж до непухлинних клітин.

У деяких варіантах, винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози, що є негативним щодо принаймні одного з ER, PR чи Her2, шляхом призначення суб'єктові, який
10 цього потребує, принаймні одного інгібітору PARP. У інших варіантах, винахід передбачає спосіб лікування раку молочної залози шляхом призначення суб'єктові, який цього потребує, принаймні одного інгібітору PARP та принаймні одного протипухлинного агента. У деяких варіантах, метаболіти відповідно до винаходу призначаються пацієнтові, який потребує такого лікування, у поєднанні з хіміотерапією з принаймні одним антиметаболітом (наприклад, одним з
15 цитабінів, таким як гемцитабін) та принаймні одним комплексом платини (наприклад, карбоплатин, цисплатин, тощо) У інших варіантах, метаболіти відповідно до винаходу, таким чином, призначаються пацієнтові, який потребує такого лікування, у поєднанні з хіміотерапією з принаймні одним таксаном (наприклад, паклітаксел чи доцетаксел) у доповнення до принаймні одного комплексу платини (наприклад, карбоплатин, цисплатин, тощо). Діапазон дозування для
20 таких метаболітів може бути в межах від близько 0.0004 до близько 0.5 ммоль/кг (мілімоль метаболіту на кілограм ваги пацієнта), при цьому дозування відповідає, на молярній основі, діапазону від близько 0.1 до близько 100 мг/кг ВА. Інші ефективні діапазони дозування метаболітів становлять 0.0024-0.5 ммоль/кг та 0.0048-0.25 ммоль/кг. Такі дози можуть призначатися відповідно до щоденного, через день, двічі на тиждень, тижневого, двотижневого,
25 місячного чи іншого прийнятного графіку. По суті однакові способи введення що й для ВА можуть застосовуватися для метаболітів, наприклад, перорально, i.v., i.p., тощо

Таксани:

Таксани є ліками, що походять від пагонів, голок та кори Тихоокеанського тисового дерева, *Taxus brevifolia*. Зокрема паклітаксел може бути отримано від 10-деацетилбакатину за
30 допомогою відомих синтетичних способів. Таксани, такі як паклітаксел та його похідний доцетаксел, продемонстрували протипухлинну активність на різних видах пухлин. Таксани впливають на звичайну функцію росту мікротрубочок шляхом гіперстабілізації їх структури, у такий спосіб знижуючи здатність клітини до використання її цитоскелету у звичний спосіб. Зокрема, таксани зв'язуються з β субодиноцею тубуліну, що є структурно-утворюючим блоком
35 мікротрубочки. Комплекс таксану/тубуліну, що утворюється, не може роз'єднатися, що призводить до аберантного функціонування клітини та подальшого некрозу клітини. Паклітаксел призводить до програмованого некрозу клітин (апоптозу) у ракових клітинах шляхом зв'язування з апоптоз-інгібуючим білком, що має назву Bcl-2 (В-клітинна лейкемія 2), таким чином, перешкоджаючи Bcl-2 інгібувати апоптоз. Таким чином, паклітаксел зарекомендував себе як
40 ефективний засіб лікування різних видів раку, оскільки він регулює шляхом зниження поділу клітин, порушуючи нормальну цитоскелетну перебудову під час поділу клітин, та призводить до апоптозу через анти-Bcl-2 механізм.

Дозування паклітакселу може змінюватися залежно від зросту, ваги, фізичного стану, розміру пухлини та прогресування, тощо. У деяких варіантах, дозування паклітакселу буде в
45 межах від близько 100 до близько 1500 мг/м², від близько 200 до близько 1250 мг/м², від близько 500 до близько 1000 мг/м², від близько 700 до 800 мг/м² чи близько 750 мг/м². Паклітаксел вводиться протягом періоду часу до близько 10 годин, до близько 8 годин, чи до близько 6 годин. Термін "близько" у цьому контексті вказує на звичайне вживання слова "приблизно"; та у деяких варіантах вказує на допуск $\pm 10\%$ чи $\pm 5\%$.

Приклади таксанів включають, але не обмежуються, доцетаксел, паклітаксел, та Абраксан.

Комплексна терапія

У деяких варіантах даного винаходу, способи відповідно до винаходу також включають лікування раку молочної залози шляхом призначення суб'єктові інгібітору PARP разом чи без
55 принаймні одного протипухлинного агента у поєднанні з іншою протираковою терапією, включаючи, але не обмежуючись, хірургію, променеву терапію (наприклад, рентгенотерапію), генну терапію, імунотерапію, терапію ДНК, ад'ювантну терапію, неoad'ювантну терапію, вірусну терапію, терапію РНК чи нанотерапію.

У випадках, коли комплексна терапія також включає немедикаментозне лікування, немедикаментозне лікування може проводитися у будь-який відповідний час тривалістю,
60 протягом якої досягається сприятливий ефект від спільної дії комбінації терапевтичних агентів

та немедикаментозного лікування. Наприклад, у відповідних випадках, сприятливий ефект все ще досягається, коли немедикаментозне лікування тимчасово відокремлюється від призначення терапевтичних агентів, на значний період часу. Кон'югати та інші фармакологічно активні агенти можуть призначатися пацієнтові одночасно, послідовно чи у їх поєднанні. Необхідно належним чином оцінити, що при використанні комбінації відповідно до винаходу, сполука винаходу та інший фармакологічно активний агент можуть знаходитися в одному фармацевтично прийнятному носіїві, а отже можуть вводитися одночасно. Вони можуть бути в окремих фармацевтичних носіях, таких як традиційні форми перорального дозування, що приймаються одночасно. Термін "комбінація" також стосується випадку, коли сполуки застосовуються в окремих формах дозування та приймаються послідовно.

Променева терапія

Променева терапія (чи рентгенотерапія) є медичним застосуванням іонізуючого опромінення як частини лікування раку з метою контролю злоякісних клітин. Рентгенотерапія може застосовуватися для цілющого чи ад'ювантного лікування раку. Вона застосовується як паліативне лікування (де вилікування не можливе та ціллю є місцевий контроль хвороби чи симптоматичне полегшення), або як терапевтичне лікування (де терапія має користь щодо виживання та може бути цілющою). Рентгенотерапію використовують для лікування злоякісних пухлин, а також вона може застосовуватися як первинна терапія. Також загальноприйнятим є комбінування рентгенотерапії з хірургією, хіміотерапією, гормональною терапією чи їх певними поєднаннями. Найпоширеніші види раку можуть лікуватися рентгенотерапією різними способами. Конкретна ціль лікування (цілюща, ад'ювантна, неоад'ювантна, терапевтична чи паліативна) буде залежати від типу пухлини, її місцезнаходження та стадії, а також від загального стану здоров'я пацієнта.

Променева терапія широко застосовується до ракових пухлин. Зони опромінення також можуть включати дренаж лімфатичних вузлів, якщо вони клінічно чи радіологічно пов'язані з пухлиною, чи коли вважається, що існує ризик субклінічного злоякісного поширення. Необхідно включати граничну зону нормальної тканини навколо пухлини з поправкою на невизначеність денного коливання та внутрішньої рухливості пухлини.

Променева терапія діє шляхом пошкодження ДНК клітини. Пошкодження спричиняється дією фотонів, електронів, протонів, нейтронів чи іонного променя, прямо чи побічно іонізуючи атоми, з яких складається ланцюг ДНК. Непряма іонізація виникає як результат іонізації води, що формує вільні радикали, зокрема гідроксильні радикали, що зрештою пошкоджують ДНК. У найпоширеніших формах променевої терапії, найбільший ефект опромінення досягається через вільні радикали. Оскільки клітини мають механізми репарації пошкодження ДНК, руйнування ДНК за обома ланцюгами зарекомендувало себе як найбільш дієвий спосіб модифікації властивостей клітини. Оскільки раку клітини зазвичай є недиференційованими та стовбурово-подібними клітинами, вони мають підвищену репродуктивність та відзначаються зниженою здатністю до репарації сублетального пошкодження порівняно з більшістю здорових диференційованих клітин. Пошкодження ДНК успадковується через клітинний поділ, накопичуючи пошкодження у ракових клітинах, що призводить до їх відмирання чи уповільнення їх репродукції. Протонна рентгенотерапія діє шляхом посилення протонів зі змінною кінетичною енергією з метою їх зупинки точно у пухлині.

Гамма опромінення також застосовується для лікування деяких видів раку, включаючи рак молочної залози. У процедурі, що має назву хірургія гамма ножом, численні концентровані промені гамма опромінення спрямовуються на новоутворення з метою знищення ракових клітин. Промені націлені під різними кутами з метою фокусування опромінення на новоутворенні, таким чином щоб мінімізувати ураження навколишніх тканин.

У деяких варіантах, гамма опромінення застосовується для лікування тричі негативного раку молочної залози та продемонстровано у Прикладі 9.

Агенти генної терапії

Агенти генної терапії вводять копії генів у конкретний набір клітин пацієнта, та можуть бути націлені як на раку клітини, так і нераку клітини. Мета генної терапії може полягати у заміні змінених генів функціональними генами з метою стимулювання імунного відгуку пацієнта на рак, щоб зробити раку клітини більш уразливими до хіміотерапії, щоб увести гени "самовбивці" до ракових клітин чи інгібувати ангіогенез. Гени можуть доставлятися до цільових клітин за допомогою вірусів, ліпосом чи інших носіїв, чи векторів. Це може здійснюватися шляхом ін'єкції композиції-носія гену безпосередньо пацієнтові, чи ex vivo, коли заражені клітини повторно вводяться пацієнтові. Такі композиції є придатними до використання у даному винаході.

Ад'ювантна терапія

Ад'ювантна терапія є лікуванням, що застосовується після первинного лікування з метою

підвищення шансів вилікування. Ад'ювантна терапія може включати хіміотерапію, променеву терапію, гормональну терапію чи біологічну терапію.

Оскільки основна ціль ад'ювантної терапії полягає в тому, щоб убити будь-які раку клітини, які могли поширитися, лікування зазвичай носить систематичний характер (використання субстанцій, що рухаються у кров'яному руслі, досягаючи та уражаючи раку клітини по всьому організмі). Ад'ювантна терапія раку молочної залози передбачає хіміотерапію чи гормональну терапію, або окремо, або у поєднанні:

Ад'ювантна хіміотерапія передбачає застосування препаратів для знищення ракових клітин. Дослідження засвідчили, що використання хіміотерапії у якості ад'ювантної терапії на ранніх стадіях раку молочної залози допомагає запобігти поверненню первинного раку. Ад'ювантна хіміотерапія є зазвичай поєднанням протиракових препаратів, що проявило себе як більш ефективне порівняно із застосуванням окремого протиракового препарату.

Ад'ювантна гормональна терапія позбавляє раку клітини жіночого гормону естрогену, якого потребують для росту деякі клітини раку молочної залози. Найчастіше, ад'ювантна гормональна терапія передбачає лікування препаратом тамоксифен. Дослідження засвідчили, що коли тамоксифен застосовується у якості ад'ювантної терапії на ранній стадії раку молочної залози, він допомагає перешкодити поверненню первинного раку, а також сприяє профілактиці розвитку нового раку в іншій молочної залозі.

Яєчник є основним джерелом естрогену до початку менопаузи. Для жінок предменопаузального віку, хворих на рак молочної залози, ад'ювантна гормональна терапія може включати тамоксифен з метою позбавлення раку клітини естрогену. Ліки, що пригнічують вироблення естрогену яєчником, досліджуються. Альтернативно, можлива хірургія з метою видалення яєчника.

Променева терапія іноді застосовується як місцеве ад'ювантне лікування. Променева терапія вважається ад'ювантним лікуванням, коли вона застосовується до чи після мастектомії. Подібне лікування має на меті зруйнувати клітини раку молочної залози, що поширилися на сусідні ділянки організму, такі як грудна клітка чи лімфовузли. Променева терапія є частиною первинної терапії, а не ад'ювантної терапії, якщо вона слідує за реконструктивною хірургією молочної залози.

Неоад'ювантна терапія

Неоад'ювантна терапія відноситься до лікування, що застосовується до первинного лікування. Приклади неоад'ювантної терапії включають хіміотерапію, променеву терапію та гормональну терапію. При лікуванні раку молочної залози, неоад'ювантна терапія дозволяє пацієнтам із розвиненим раком молочної залози перенести консервативну хірургію молочної залози.

Онколітична вірусна терапія

Вірусна терапія раку використовує тип вірусів, що називаються онколітичними вірусами. Онколітичний вірус є вірусом, який здатен інфікувати та викликати лізис ракових клітин, при цьому залишаючи нормальні клітини неушкодженими та роблячи їх потенційно корисними для терапії раку. Реплікація онколітичних вірусів як сприяє руйнуванню клітин пухлини, так і спричиняє ампліфікацію дози на ділянці пухлини. Вони також можуть діяти як вектори для протиракових генів, забезпечуючи їх цілеспрямоване транспортування до ділянки пухлини.

Існує два основних підходи щодо генерування селективності пухлини: трансдукційне та нетрансдукційне націлювання. Трансдукційне націлювання передбачає модифікацію специфіки білку вірусної оболонки, таким чином, підвищуючи проникнення у цільові клітини, при цьому скорочуючи проникнення до нецільових клітин. Нетрансдукційне націлювання передбачає зміну геному вірусу у такий спосіб, що він здатен відтворюватися тільки у ракових клітинах. Цього можливо досягти або транскрипційним націлюванням, коли гени, потрібні для вірусної реплікації, розміщуються під контролем промотору, притаманному пухлині, або шляхом ослаблення вірулентності, що передбачає введення делецій у вірусний геном, які усувають функції, необов'язкові для ракових клітин, але не для нормальних клітин. Існують також інші, дещо більш недосліджені способи.

Чен та інші (2001) використовували CV706, аденовірус, притаманний простаті, у поєднанні з рентгенотерапією щодо раку простати у мишей. Результатом комбінованого лікування було синергічне підвищення некрозу клітин, а також значне збільшення величини виходу фагу вірусу (кількості вірусних часток, що вивільнюються в результаті лізису кожної клітини).

ONYX-015 пройшов випробування у поєднанні з хіміотерапією. Комбіноване лікування має вищий показник відгуку порівняно з кожним окремим лікуванням, але результати не були цілком переконливими. ONYX-015 засвідчив перспективи у поєднанні з рентгенотерапією.

Вірусні агенти, що вводяться внутрішньо, можуть бути особливо ефективними проти видів

метастатичного раку, що є надзвичайно складними у лікуванні традиційними способами. Проте, віруси, що передаються з кров'ю, можуть бути дезактивовані антитілами та швидко виводяться з кровотоку, наприклад, клітинами Купфера (надзвичайно активні фагоцитарні клітини у печінці, що відповідають за виведення аденовірусу). Ухилення від імунної системи до тих пір, поки пухлина буде зруйнована, може бути найбільшою перешкодою для успіху онколітичної вірусної терапії. На сьогоднішній день жодна з методик, що використовуються для обходу імунної системи, не є повністю задовільною. Саме у поєднанні з традиційними видами протиракової терапії, онколітичні віруси виявляються найбільш перспективними, оскільки комплексні терапії діють синергічно без виражених негативних ефектів.

Специфічність та гнучкість онколітичних вірусів означає, що вони мають потенціал до лікування різних видів раку, включаючи рак молочної залози, з мінімальними побічними ефектами. Онколітичні віруси мають потенціал до вирішення проблеми селективного знищення ракових клітин.

Нанотерапія

Нанометрові частки відзначаються новими оптичними, електронними та структурними властивостями, що не є притаманними або окремим молекулам, або основній масі. Коли пов'язані з частинами націленими на пухлину, такими як ліганди, притаманні пухлинам, чи моноклональними антитілами, ці наночастки можуть застосовуватися для націлювання на рецептори, притаманні раку, антигени пухлини (біомаркери) та судинні мережі пухлини з високою спорідненістю та точністю. Формулювання та спосіб застосування нанотерапії раку розкривається у патенті США US7179484, та статті М.Н. Халіда, П. Сімарда, Д. Хоару, А. Драгоміра, Ж. Леру, "Полі(етилен гліколь) декоровані ліпідні нанокapsули тривалої циркуляції, що доставляють доцетаксел до солідних пухлин", Фармацевтичні дослідження, 23(4), 2006, що усі включені до цієї специфікації у повному об'ємі шляхом посилання на них.

Терапія РНК

РНК, включаючи, але не обмежуючись, siRNA, shRNA чи мікроРНК, можуть застосовуватися для модуляції генної експресії та лікування раку. Дволанцюгові олігонуклеотиди формуються шляхом поєднання двох різних послідовностей олігонуклеотидів, де послідовність олігонуклеотидів одного ланцюга доповнює послідовність олігонуклеотидів другого ланцюга; такі дволанцюгові олігонуклеотиди зазвичай утворюються з двох окремих олігонуклеотидів (наприклад, siRNA), чи формують єдину молекулу, що складається сама, щоб сформувати дволанцюгову структуру (наприклад, shRNA чи "шпилька" РНК). Ці дволанцюгові олігонуклеотиди відомі у даній галузі як такі, що усі мають спільну особливість, яка виражається в тому, що кожен ланцюг дуплексу має різну нуклеотидну послідовність, де тільки одна ділянка нуклеотидної послідовності (направляюча послідовність чи антисенсова послідовність) має компліментарність до цільової послідовності нуклеїнової кислоти, а інший ланцюг (сенсова послідовність) містить нуклеотидну послідовність, що є гомологічною до цільової послідовності нуклеїнової кислоти.

МікроРНК (miRNA) є одноланцюговими молекулами РНК завдовжки близько 21–23 нуклеотидів, які регулюють генну експресію. miRNA кодуються генами, що транскрибовані від ДНК, але не транскрибуються у білок (некодує РНК); натомість вони трансформуються з первинних транскриптів, відомих як pri-miRNA, у структури з короткостовбуровою петлею, що називають pre-miRNA та зрештою у функціональні miRNA. Дозрілі молекули miRNA є частково комплементарними до однієї чи кількох інформаційних молекул РНК (mRNA), та їх основна функція полягає у зниженні активності генної експресії.

Деякі інгібуючі агенти РНК можуть використовуватися для інгібування експресії чи трансляції інформаційної РНК ("mRNA"), що є пов'язаною з фенотипом раку. Приклади таких агентів, придатних для використання у цій специфікації включають, але не обмежуються, коротку інтерферуючу РНК ("siRNA"), рибозими та антисенсові олігонуклеотиди. Конкретні приклади інгібуючих агентів РНК, придатних для використання у цій специфікації включають, але не обмежуються, Cand5, SiRNA-027, фомівірсен, та ангіозим.

Дрібно молекулярні ферментативні інгібітори

Деякі дрібномолекулярні терапевтичні агенти є здатними до націлювання на ферментативну активність тирозин кінази чи на передачу вниз сигналів сигнальної трансдукції деяких рецепторів клітин, таких як рецептор епідермального фактору росту ("EGFR") чи рецептор судинного ендотеліального фактору росту ("VEGFR"). Таке націлювання дрібномолекулярними терапевтиками може призводити до протиракових ефектів. Приклади таких агентів, придатних для використання у цій специфікації включають, але не обмежуються, іматиніб, гефітиніб, ерлотиніб, лапатиніб, канертиніб, ZD6474, сорафеніб (BAY 43-9006), ERB-569 та їх аналоги та похідні.

Проти-метастатичні агенти

Процес поширення ракових клітини від місця первинної пухлини до інших ділянок тіла називається раковими метастазами. Деякі агенти мають проти-метастатичні властивості, призначені інгібувати поширення ракових клітин. Приклади таких агентів, придатних для використання у цій специфікації включають, але не обмежуються, марімастат, бевацизумаб, трастузумаб, рітуксімаб, ерлотиніб, MMI-166, GRN163L, пептиди "мисливці-кілери", тканинні інгібітори матричних металопротеїназ (TIMPs), їхні аналоги, похідні та різновиди.

Хіміопреventивні агенти

Деякі фармацевтичні агенти можуть застосовуватися для профілактики первинної появи раку, чи для попередження рецидиву чи метастаз. Призначення таких хіміопреventивних агентів у поєднанні з ефлорнітин-NSAID кон'югатами відповідно до винаходу може використовуватись як для лікування, так і для профілактики рецидивів раку. Приклади хіміопреventивних агентів включають, але не обмежуються, тамоксифен, ралоксифен, тіболон, бісфосфонат, ібандронат, модулятори естрогенових рецепторів, інгібітори ароматази (летрозол, анастрозол), агоністи гормону, що вивільняють лютеїнізуючий гормон, гозерелін, вітамін А, ретінал, ретиноеву кислоту, фенретинід, 9-цис-ретиноеву кислоту, 13-цис-ретиноеву кислоту, повністю трансретиноеву кислоту, ізотретиноїн, третиноїд, вітамін В6, вітамін В12, вітамін С, вітамін D, вітамін Е, інгібітори циклооксигенази, нестероїдні протизапальні препарати (NSAIDs), аспірин, ібупрен, целекоксіб, поліфеноли, поліфенол Е, екстракт зеленого чаю, фолієва кислота, глюкова кислота, інтерферон-альфа, анетол дитіолетіон, цинк, піридоксин, фінастерід, доксазозин, селен, індол-3-карбінал, альфа-диформетилорнітин, каротиноїди, бета-каротин, лікопін, антиоксиданти, коферменти Q10, флавоноїди, кверцетин, куркумін, катехіни, епігалокатехін галат, N-ацетилцистеїн, індол-3-карбінол, інозитол гексафосфат, ізофлавоїди, глюкова кислота, розмарин, соя, пальма серена та кальцій. Додатковим прикладом хіміопреventивних агентів, придатних для використання у даному винаході, є вакцини проти раку. Вони можуть бути створені шляхом імунізації пацієнта проти усіх чи частини видів ракових клітин, що є ціллю процесу вакцинації.

Клінічна ефективність:

Стадійність раку молочної залози:

Стадія 0 використовується для опису неінвазивних типів раку молочної залози, таких як DCIS та LCIS. На стадії 0, не існує доказу того, що раку клітини чи доброякісні клітини з відхиленнями відокремилися від частини молочної залози, де вони спочатку виникли, чи проникли, чи уразили сусідню нормальну тканину.

Стадія I описує інвазивний рак молочної залози (раку клітини проникають чи уражають сусідню нормальну тканину), при якому пухлина має розмір до 2 сантиметрів та лімфовузли не уражені.

Стадія II поділяється на підкатегорії, відомі як IIA та IIB. Стадія IIA описує інвазивний рак молочної залози, при якому у молочній залозі відсутня пухлина, але раку клітини присутні у пахвових лімфовузлах (лімфовузли під пахвами), чи пухлина має розмір 2 сантиметри або менше та поширилася до пахвових лімфовузлів, чи пухлина більше 2 сантиметрів, але не більше 5 сантиметрів та не поширилася до пахвових лімфовузлів. Стадія IIB описує інвазивний рак молочної залози, при якому пухлина є більшою ніж 2, але не більшою ніж 5 сантиметрів та поширилася до пахвових лімфовузлів, чи пухлина є більшою ніж 5 сантиметрів, але не поширилася до пахвових лімфовузлів.

Стадія III поділяється на підкатегорії, відомі як IIIA, IIIB та IIIC. Стадія IIIA описує інвазивний рак молочної залози, при якому пухлина відсутня у молочній залозі. Рак знаходиться у пахвових лімфовузлах, що згруповані разом чи тримаються за інші структури, чи рак міг поширитися до лімфовузлів поблизу грудної кістки, чи пухлина має за розміром 5 сантиметрів чи менше та поширилася до пахвових лімфовузлів, що згруповані разом чи тримаються за інші структури, чи пухлина має за розміром більше 5 сантиметрів та поширилася до пахвових лімфовузлів, що згруповані разом чи тримаються за інші структури. Стадія IIIB описує інвазивний рак молочної залози, при якому пухлина може бути будь-якого розміру та поширилася до стінки грудної клітини та/чи шкіри молочної залози та могла поширитися до пахвових лімфовузлів, що згруповані разом чи тримаються за інші структури, чи рак міг поширитися до лімфовузлів поблизу грудної кістки. Стадія IIIC описує інвазивний рак молочної залози, при якому ознаки раку молочної залози можуть бути відсутні чи, якщо є пухлина, вона може бути будь-якого розміру та могла поширитися до стінки грудної клітини та/чи шкіри молочної залози, та рак поширився до лімфовузлів вище або нижче ключиці, та рак міг поширитися до пахвових лімфовузлів чи до лімфовузлів поблизу грудної кістки.

Клінічна ефективність може вимірюватися у будь-який спосіб, відомий у даній галузі. У

деяких варіантах, клінічна ефективність терапевтичного лікування, описана у цій специфікації, може визначатися шляхом вимірювання показника клінічної ефективності (CBR). Показник клінічної ефективності вимірюється шляхом визначення сумарного відсотку пацієнтів, які знаходяться на стадії повної ремісії (CR), кількості пацієнтів з частковою ремісією (PR) та кількості пацієнтів, що мають стабілізацію хвороби (SD) на момент часу принаймні 6 місяців після завершення терапії. Умовним позначенням цієї формули є $CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців. CBR для комплексної терапії з гемцитабіном та карбоплатином становить 45 %. Таким чином, CBR для тричі комплексної терапії з антиметаболітом, комплексом платини та інгібітором PARP (наприклад, гемцитабіном, карбоплатином та BA; CBR_{GCB}) може порівнюватися з двічі комплексною терапією з гемцитабіном та карбоплатином (CBR_{GC}). У деяких варіантах, CBR_{GCB} становить принаймні близько 60 %. У деяких варіантах, CBR становить принаймні близько 30 %, принаймні близько 40 % чи принаймні близько 50 %. CBR для комплексної терапії з паклітакселом та карбоплатином становить 45 %. Таким чином, CBR для тричі комплексної терапії з таксаном, комплексом платини та інгібітором PARP (наприклад, паклітакселом, карбоплатином та BA; CBR_{GCB}) може порівнюватися з двічі комплексною терапією з паклітакселом та карбоплатином (CBR_{GC}). У деяких варіантах, CBR_{GCB} становить принаймні близько 60 %.

У деяких варіантах, CBR становить принаймні близько 30 %, принаймні близько 40 % чи принаймні близько 50 %. У деяких варіантах, терапевтичний ефект включає зменшення розміру пухлини молочної залози, скорочення метастаз, повну ремісію, часткову ремісію, стабілізацію хвороби чи повну патоморфологічну регресію.

Неоад'ювантна хіміотерапія також наразі широко застосовується для лікування місцево прогресуючого чи потенційно операбельного обширного раку молочної залози. Дослідження методом випадкової вибірки продемонстрували, що неоад'ювантна хіміотерапія зменшує потребу у мастектомії (Паулз та інші 1995; Фішер та інші 1998) при загальному коефіцієнті виживання, подібному до ад'ювантної хіміотерапії (Фішер та інші 1998). Серед жінок, у яких відсутні остаточні гістологічні прояви пухлини після хіміотерапії на час хірургії (наприклад, при повній патоморфологічній регресії (pCR)) спостерігався значно покращений рівень виживання (Бонадонна та інші 1998; Фішер та інші 1998; Куерер та інші 1999), а pCR часто використовується як ранній заміник маркера ефективності лікування. Проте, не існує стандартних способів класифікації патоморфологічного відгуку пухлини на неоад'ювантну хіміотерапію, та було запропоновано цілий ряд різних систем класифікації (Шевальє та інші 1993; Саталоф та інші 1995; Фішер та інші 1997; Хонкуп та інші 1998; Куерер та інші 1998; Огстон та інші 2003). Більшість, але не всі, з цих схем класифікації охоплювали як відсутність остаточної хвороби будь-якого виду, так і остаточну внутрішньопротокову карциному in situ (DCIS) без інвазивної хвороби у визначенні pCR.

У деяких варіантах, що розкриваються у цій специфікації, способи включають попереднє визначення, чи рак є виліковним за допомогою модуляторів PARP. Деякі з таких способів включають ідентифікацію рівня PARP у зразкові раку молочної залози пацієнта, визначення, чи рівень експресії PARP у зразкові перевищує попередньо встановлене значення, та, якщо експресія PARP перевищує зазначене встановлене значення, лікування пацієнта у поєднанні з таксаном (наприклад, паклітакселом), комплексом платини (наприклад, карбоплатином) та інгібітором PARP, таким як BA. У інших варіантах, способи включають ідентифікацію рівня PARP у зразкові раку молочної залози пацієнта, визначення, чи рівень експресії PARP у зразкові перевищує попередньо встановлене значення, та, якщо експресія PARP перевищує зазначене встановлене значення, лікування пацієнта інгібітором PARP, таким як BA. У інших варіантах, способи включають попереднє визначення, чи рак є виліковним за допомогою модуляторів PARP. Деякі з таких способів включають ідентифікацію рівня PARP у зразкові раку молочної залози пацієнта, визначення, чи рівень експресії PARP у зразкові перевищує попередньо встановлене значення, та, якщо експресія PARP перевищує зазначене встановлене значення, лікування пацієнта у поєднанні з антиметаболітом (наприклад, гемцитабіном), комплексом платини (наприклад, карбоплатином) та інгібітором PARP, таким як BA.

Пухлини молочної залози у жінок, які успадковують дефекти або генів BRCA1, або BRCA2, виникають через те, що клітини пухлини втратили спеціальний механізм репарації пошкодженої ДНК. BRCA1 та BRCA2 є важливими для репарації дволанцюгових розривів ДНК шляхом гомологічної рекомбінації, а мутації у цих генах визначають схильність до раку молочної залози та інших видів раку. PARP є задіяним у репарації шляхом відщеплення (ексцизійній репарації), що є шляхом репарації одноланцюгових розривів ДНК. Дисфункція BRCA1 чи BRCA2 робить клітини чутливими до інгібування ферментативної активності PARP, що призводить до хромосомної нестабільності, зупинки клітинного циклу та наступного апоптозу (Джонс С,

Пламмер СР. "Інгібітори PARP та терапія раку - початкові результати та потенційне застосування". Британський вісник з радіології, жовтень 2008 р.; 81 Спеціальний випуск № 1:S2-5; Дрю І, Кальверт Х. "Потенціал інгібіторів PARP щодо генетичного раку молочної залози та яєчника". Енн, Нью-Йоркська академія наук вересень 2008 р.; 1138:136-45; Фармер Х, та інші
 5 "Націлювання на дефекти репарації ДНК у мутованих клітинах BRCA як терапевтична стратегія". Природа. 14 квітня 2005 р.; 434(7035):917-21).

Пацієнти з дефіцитом генів BRCA мають підвищені рівні функціональної активності PARP. Підвищена функціональна активність PARP може бути індикатором дефектних шляхів репарації ДНК та нерозпізнаних BRCA-подібних генетичних дефектів. Оцінка генної експресії PARP та
 10 репарації ушкодженої ДНК, зокрема дефектної репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації, може застосовуватися як індикатор чутливості пухлини до інгібітору PARP. Таким чином, у деяких варіантах, лікування раку молочної залози може бути покращене не тільки завдяки визначенню статусу HR та/чи HER2 раку, але також шляхом ідентифікації на ранніх стадіях раку у пацієнтів, які мають дефекти BRCA та репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації,
 15 визначивши рівень PARP. Пацієнти, які мають дефекти BRCA та репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації, щодо яких застосовують лікування інгібіторами PARP, можуть бути ідентифіковані, якщо функціональна активність PARP є підвищеною. Після чого такі пацієнти з дефектом репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації можуть проходити лікування інгібіторами PARP.

У деяких варіантах, зразок береться у пацієнта, який має ураження молочної залози чи новоутворення з підозрою на злоякісність. Попри те, що такий зразок може бути будь-якою доступною біологічною тканиною, у більшості випадків зразок буде часткою патологічного утворення молочної залози, що викликає підозру, отриманий або за допомогою мінімально інвазивної біопсії, або за допомогою терапевтичної хірургії (наприклад, лампектомії,
 25 мастектомії, часткової чи модифікованої мастектомії чи радикальної мастектомії, гістеректомії, чи овариєктомії). Такий зразок також може включати увесь чи частину одного чи кількох лімфовузлів, видалених під час терапевтичної хірургії. Таким чином, можливе проведення аналізу експресії PARP. У деяких варіантах, якщо експресія PARP перевищує встановлений рівень (наприклад, має підвищену функціональну активність порівняно з нормальною
 30 тканиною), пацієнту може призначатися лікування інгібітором PARP у поєднанні з антиметаболітом та агентом платини. У інших варіантах, якщо експресія PARP перевищує встановлений рівень (наприклад, має підвищену функціональну активність порівняно з нормальною тканиною), пацієнту може призначатися лікування інгібітором PARP, включаючи інгібітор PARP, такий як BA. Таким чином, слід розуміти, що оскільки варіанти, описані у цій специфікації спрямовані на лікування тричі негативного метастатичного раку молочної залози, у
 35 деяких варіантах раку молочної залози не повинен мати таких характеристик, за умови, що граничне значення підвищеної активності PARP є задовільним.

У деяких варіантах, пухлини, що мають дефіцит на гомологічну рекомбінацію, ідентифікуються шляхом оцінювання рівнів експресії PARP. Якщо спостерігається підвищена функціональна активність PARP, такі пухлини можуть піддаватися лікуванню інгібіторами PARP.
 40 Інший варіант передбачає спосіб лікування раку, що відзначається дефіцитом гомологічної рекомбінації, включаючи оцінку рівня експресії PARP та, якщо спостерігається гіперекспресія, раку піддається лікуванню інгібітором PARP.

Збір, приготування та відокремлення зразків

Біологічні зразки можуть відбиратися із різних джерел у пацієнта, включаючи зразки рідини організму чи зразки тканини. Відібрані зразки можуть нормальними зразками людини та зразками пухлини, виділеннями сосків. Зразки можуть відбиратися у пацієнта неодноразово протягом подовжнього періоду часу (наприклад, близько разу на день, разу на тиждень, разу на місяць, двічі на рік чи щороку). Отримання чисельних зразків від особи протягом певного
 50 періоду часу може застосовуватися з метою перевірки результатів попереднього виявлення та/чи визначення змін у біологічній структурі в результаті, наприклад, прогресування хвороби, медикаментозного лікування, тощо.

Приготування та відокремлення зразка можуть передбачати будь-які процедури, залежно від типу відібраного зразка та/чи аналізу PARP. Такі процедури включають, лише у якості прикладів, концентрацію, розчинення, корекцію рН, видалення надмірної кількості поліпептидів (наприклад, альбуміну, гамма глобуліну та трансферину, тощо), додавання консервантів та калібрантів, додавання інгібіторів протеази, додавання денатуруючих засобів, де мінералізація зразків, концентрація зразків білків, екстракція та очищення ліпідів.

Приготування зразків також може передбачати ізоляцію молекул, що є зв'язаними у нековалентних комплексах з іншими білками (наприклад, білками-носіями). Цей процес може

ізолювати молекули, зв'язані з певним білком-носієм (наприклад, альбумином), чи застосовувати більш загальний процес, такий як вивільнення зв'язаних молекул з усіх білків-носіїв шляхом денатурації білку, наприклад, використовуючи кислоту, що супроводжується видаленням білків-носіїв.

5 Видалення небажаних білків (наприклад, надмірної кількості, неінформативних білків чи таких, що не піддаються визначенню) зі зразка може досягатися за допомогою використання високо-споріднених реагентів, високомолекулярних фільтрів, ультрацентрифугування та/чи електродіалізу. Високо-споріднені реагенти включають антитіла чи інші реагенти (наприклад, аптамери), що селективно зв'язуються з білками, що містяться у надмірній кількості.

10 Приготування зразка також може включати іонообмінну хроматографію, металево-іонну афінну хроматографію, гель-фільтрацію, гідрофобну хроматографію, хроматофокусування, адсорбційну хроматографію, ізоелектричне фокусування та пов'язані з ними методики. Молекулярні фільтри мають мембрани, що відокремлюють молекули за розміром та молекулярною масою. У таких фільтрах також можуть застосовувати зворотній осмос,

15 нонофільтрацію, ультрафільтрацію та мікрофільтрацію.

Ультрацентрифугування є способом для видалення небажаних поліпептидів зі зразка. Ультрацентрифугування представляє собою центрифугування зразка при близько 15,000-60,000 обертів на хвилину з одночасним моніторингом за допомогою оптичної системи седиментації (чи її відсутності) часток. Електродіаліз є процедурою, що використовує

20 електромембрану чи напівпроникну мембрану у процесі, в якому іони транспортуються через напівпроникну мембрану з одного розчину до іншого під впливом градієнта потенціалу. Оскільки мембрани, що використовуються в електродіалізі, можуть мати здатність до селективного транспортування іонів, що мають позитивний чи негативний заряд, відхиляти іони з протилежним зарядом, чи дозволяти зразкам мігрувати через напівпроникну мембрану залежно від розміру та заряду, це робить електродіаліз корисним для концентрації, видалення чи відокремлення електролітів.

Відокремлення та очищення у даному винаході можуть включати будь-яку процедуру, відому у даній галузі, таку як капілярний електрофорез (наприклад, на капілярі чи на чипі) чи хроматографію (наприклад, капілярну, колонкову чи на чипі). Електрофорез є способом, який

30 може застосовуватися до окремих іонних молекул під впливом електричного поля. Електрофорез може проводитися у гелеві, капілярах, чи у мікроканалі на чипі. Приклади гелів, що використовуються для електрофорезу, включають крохмаль, акриламід, оксиди поліетилену, агарозу чи їх поєднання. Гель може бути модифікований шляхом свого поперечного зшивання, додавання детергентів, чи денатурантів, іммобілізації ферментів чи антитіл (афінний електрофорез) чи субстратів (зимографія) та включення рН градієнта. Приклади капілярів, що використовуються для електрофорезу включають капіляри, які взаємодіють з електроспреем.

Капілярний електрофорез (CE) є переважним для відокремлення комплексних гідрофільних молекул та високо-заряджених розчинів. Технологія CE також може бути реалізована на мікрофлюїдних чипах. Залежно від типів капіляру та буферів, що використовуються, CE також

40 може поділитися на методики відокремлення, такі як капілярний зонний електрофорез (CZE), капілярне ізоелектричне фокусування (CIEF), капілярний ізотахофорез (cITP) та капілярна електрохроматографія (CEC). Варіант поєднання методик CE з електроспреевою іонізацією передбачає використання летких розчинів, наприклад, водних сумішей, містять летку кислоту та/чи основу та органічну речовину, таку як спирт чи ацетонітрил.

Капілярний ізотахофорез (cITP) є методикою, при якій сполуки, що аналізуються, пропускаються через капіляр з постійною швидкістю, але попри це відрізняються за своєю властивістю мобільністю. Капілярний зонний електрофорез (CZE), також відомий як CE вільного розчину (FSCE), ґрунтується на розбіжностях електрофоретичної мобільності зразків, що визначається зарядом у молекулі, та фрикційним опором, з яким молекула зіштовхується під час міграції, що часто є прямо пропорційним розміру молекули. Капілярне ізоелектричне

50 фокусування (CIEF) дозволяє відокремлювати слабо-іонізуючі амфотерні молекули шляхом електрофорезу на рН градієнті. CEC є гібридною методикою між традиційною високоефективною рідинною хроматографією (HPLC) та CE.

Методики відокремлення та очищення, що використовуються у даному винаході, включають

55 будь-які хроматографічні процедури, відомі у даній галузі. Хроматографія може ґрунтуватися на диференційній адсорбції та елююванні певних сполук, що аналізуються, чи фракціонуванні сполук, що аналізуються, між мобільними та стаціонарними фазами. Різні приклади хроматографії включають, але не обмежуються, рідинну хроматографію (LC), газову хроматографію (GC), високоефективну рідинну хроматографію (HPLC), тощо.

60 Визначення рівня PARP

Полі (ADP-рібоза) полімераза (PARP) є також відомою як полі (ADP-рібоза) синтетаза та полі ADP-рібозілтрансфераза. PARP каталізує формування моно- та полі- (ADP-рібоза) полімерів, які можуть приєднуватися до клітинних білків (а також до самих себе), та у такий спосіб модифікують активність цих білків. Фермент відіграє роль у регулюванні транскрипції, проліферації клітин та хроматиновому ремоделюванні (для огляду дивіться: Д. Д'амур та інші "Реакції полі (ADP-) рибозилування у регулюванні нуклеарних функцій," Вісник з біохімії 342: 249-268 (1999)).

PARP включає N-кінцевий домен, що зв'язує ДНК, домен автомодифікації та C-кінцевий каталітичний домен, та різні клітинні білки, що взаємодіють з PARP. N-кінцевий домен, що зв'язує ДНК, містить два мотиви (повтори) типу "цинкових пальців". Фактор посилення транскрипції -1 (TEF-1), рецептор α ретиноїду X, полімераза α ДНК, перехресно-комплементарний фактор репарації рентгенівським опроміненням -1 (XRCC1) та власне сам PARP взаємодіють з PARP у цьому домені. Домен автомодифікації містить мотив BRCT, одного з білок-білкових модулів взаємодії. Цей мотив спочатку міститься у C-терміналі BRCA1 (білок 1, вразливий до раку молочної залози) та є присутнім у різних білках, пов'язаних з репарацією ДНК, рекомбінацією та контролем контрольних точок клітинного циклу. Фактор транскрипції октамеру, що містить POU-гомеодомен -1 (Oct-1), Інх Янь (YY)1 та убіквітин-кон'югуючий фермент 9 (ubc9) можуть взаємодіяти з цим мотивом BRCT у PARP.

Понад 15 членів генної родини PARP присутні у геномі ссавців. Білки родини PARP та полі(ADP-рібоза) глікогідролаза (PARG), що деградує полі(ADP-рібозу) до ADP-рібози, можуть бути залучені до різних регуляторних функцій клітин, включаючи відгук на ушкодження ДНК та транскрипційне регулювання, та можуть бути пов'язані з канцерогенезом та біологією раку у багатьох відношеннях.

Було ідентифіковано декілька білків родини PARP. Танкіраза була визначена як взаємодіючий білок регуляторного фактору теломеру 1 (TRF-1) та є залученою до регулювання теломеру. Склепінчастий PARP (VPARP) є компонентом склепінчастого комплексу, який діє як нуклеарно-цитоплазматичний транспортер. PARP-2, PARP-3 та 2,3,7,8-тетрахлордобензо-р-діоксин індукований PARP (TiPARP) також були ідентифіковані. Таким чином, метаболізм полі (ADP-рібози) може бути пов'язаний із різними регуляторними функціями клітини.

Членом цієї генної родини є PARP-1. Генний продукт PARP-1 виражений на високих рівнях у ядрах клітин та його активація є залежною від ушкодження ДНК. Не прив'язуючись до якоїсь певної теорії, вважається, що PARP-1 зв'язується з одно- чи дволанцюговими розривами ДНК через аміно-кінцевий ДНК домен, що зв'язує. Зв'язування активує карбоксил кінцевий каталітичний домен та призводить до формування полімерів ADP-рібози у цільових молекулах. PARP-1 сам є ціллю полі ADP-рибозилування завдяки центрально-розташованому домену автомодифікації. Рибозилування PARP-1 спричиняє дисоціацію молекул PARP-1 від ДНК. Увесь процес зв'язування, рибозилування та дисоціації протікає дуже швидко. Вважається, що таке транзиторне зв'язування PARP-1 з ділянками ушкодженої ДНК призводить до рекрутменту механізму репарації ДНК чи може діяти на пригнічення рекомбінації достатньо довго для рекрутменту механізму репарації.

Джерелом ADP-рібози для реакції PARP є нікотинамід аденозин динуклеотид (NAD). NAD синтезується у клітинах з резервів клітинних ATP та, таким чином, високі рівні активації PARP активності можуть швидко призводити до вичерпання резервів клітинної енергії. Було продемонстровано, що індукція активності PARP може призводити до некрозу клітин, який корелюється з вичерпанням пулів клітинних NAD та ATP. Активність PARP індукується у багатьох прикладах внаслідок окислювального стресу чи під час запалення. Наприклад, під час реперфузії ішемічних тканин генерується реактивний окис азоту, а окис азоту призводить до генерування додаткових реактивних кисневих речовин, включаючи перекис водню, пероксинітрат та радикал гідроксилу. Останні речовини можуть безпосередньо пошкоджувати ДНК, а пошкодження, що виникає, призводить до активації PARP активності. Часто, спостерігається, що достатня активація PARP активності протікає таким чином, що резерви клітинної енергії вичерпуються та клітина відмирає. Вважається, що подібний механізм діє під час запалення, коли ендотеліальні клітини та прозапальні клітини синтезують окис азоту, який призводить до окислювального пошкодження ДНК у навколишніх клітинах та подальшої активації PARP активності. Некроз клітин, що є результатом активації PARP, вважається основним чинним фактором в межах пошкодження тканини, який виникає внаслідок ішемічно-реперфузійного пошкодження чи запалення.

У деяких варіантах, рівень PARP у зразку пацієнта порівнюється з попередньо визначеним стандартним зразком. Зразок пацієнта є зазвичай зразком хворої тканини, такої як раку клітини чи тканини. Стандартний зразок може бути взятий від цього ж пацієнта чи від іншого суб'єкта.

Стандартний зразок зазвичай є нормальним, здоровим зразком. Проте, у деяких варіантах, таких як наприклад визначення стадійності хвороби чи оцінка ефективності лікування, стандартний зразок відбирається з хворої тканини. Стандартний зразок може бути комбінацією зразків декількох різних суб'єктів. У деяких варіантах, рівень PARP пацієнта порівнюється з

5 попередньо визначеним рівнем. Цей попередньо визначений рівень зазвичай отримано на основі нормальних зразків. Як описано у цій специфікації, "попередньо визначений рівень PARP" може бути рівнем PARP, що використовується, тільки як приклад, для оцінки пацієнта, якому може бути призначене лікування, для оцінки відгуку на лікування інгібітором PARP, для оцінки відгуку на лікування поєднанням інгібітору PARP та другого терапевтичного агенту, та/чи

10 для діагностики пацієнта на предмет раку, запалення, болю та/чи пов'язаних з ними умов. Попередньо визначений рівень PARP може визначатися на основі сукупності пацієнтів, що хворіють на рак чи є здоровими. Попередньо визначений рівень PARP може бути єдиним числом, що однаковою мірою застосовується до кожного пацієнта, чи попередньо визначений рівень PARP може варіюватися відповідно до конкретних підгруп пацієнтів. Наприклад, чоловіки повинні мати інший попередньо визначений рівень PARP ніж жінки; некурці повинні мати інший

15 попередньо визначений рівень PARP ніж курці. Вік, вага та зріст пацієнта можуть впливати на попередньо визначений рівень PARP особи. Крім того, попередньо визначений рівень PARP може бути рівнем, що визначається для кожного пацієнта індивідуально. Попередньо визначений рівень PARP може відповідати будь-якому прийнятному стандарту. Наприклад,

20 попередньо визначений рівень PARP може бути отримано від однієї людини чи різних людей, для яких проводиться оцінка щодо відбору пацієнтів. У одному варіанті, попередньо визначений рівень PARP може бути отримано на основі раніше проведеної оцінки того самого пацієнта. У такий спосіб, можливе здійснення моніторингу прогресу відбору пацієнта через певні проміжки часу. Крім того, стандарт може бути отримано на основі оцінки іншої людини чи багатьох людей,

25 наприклад, на основі відібраних груп людей. У такий спосіб, межі відбору людини, для якої проводиться оцінка відбору, можуть порівнюватися з іншими відповідними людьми, наприклад, іншими людьми, які знаходяться у ситуації, подібній до ситуації людини, що є предметом оцінки, тобто з тими, хто страждає від подібних чи таких самих умов.

У деяких варіантах даного винаходу зміна PARP порівняно з попередньо визначеним рівнем становить близько 0.5 разів, близько 1.0 разу, близько 1.5 разу, близько 2.0 разів, близько 2.5 разів, близько 3.0 разів, близько 3.5 разів, близько 4.0 разів, близько 4.5 разів, чи близько 5.0 разів. У деяких варіантах разова зміна становить менше ніж близько 1, менше ніж близько 5, менше ніж близько 10, менше ніж близько 20, менше ніж близько 30, менше ніж близько 40, чи менше ніж близько 50. У інших варіантах, зміни рівня PARP порівняно з визначеним рівнем становлять більше ніж близько 1, більше ніж близько 5, більше ніж близько 10, більше ніж близько 20, більше ніж близько 30, більше ніж близько 40, чи більше ніж близько 50. Разові зміни, яким надається перевага, відносно попередньо визначеного рівня становлять близько 0.5, близько 1.0, близько 1.5, близько 2.0, близько 2.5 та близько 3.0.

Аналіз рівнів PARP у пацієнтів є надзвичайно цінним та інформативним, оскільки він дозволяє терапевтові більш ефективно обирати найкраще лікування, а також застосовувати більш агресивні види лікування та режими терапії залежно від підвищеного чи пониженого рівнів активності PARP. Більш агресивне лікування, чи комбіновані лікування та режими, можуть протидіяти несприятливим прогнозам для пацієнта та впливати на загальну тривалість виживання. Озброївшись цією інформацією, практикуючий лікар може обирати певні типи лікування, такі як лікування інгібіторами PARP, та/чи більш агресивну терапію.

Під час моніторингу рівнів PARP у пацієнта протягом періоду часу, що може становити дні, тижні, місяці, та у деяких випадках, роки, чи їх різні інтервали, зразок рідини організму пацієнта, наприклад, сироватка чи плазма, може відбиратися з інтервалами, які визначаються практикуючим лікарем, таким як терапевт чи клінічний лікар, з метою визначення рівнів PARP, та порівнюється з рівнями нормальних людей після завершення курсу чи лікування, чи хвороби. Наприклад, зразок пацієнта може відбиратися та піддаватися моніторингу щомісяця, кожні два місяці, чи у комбінації одно-, дво- чи тримісячного інтервалів відповідно до винаходу. Крім того, рівні PARP пацієнта, отримані через певний час, можуть у зручний спосіб порівнюватися одне з одним, а також зі значеннями PARP, отриманими звичними способами контролю, під час періоду моніторингу, таким чином, дозволяючи отримати власні значення PARP пацієнта, для внутрішнього чи персонального контролю з метою довгострокового моніторингу PARP.

Методики аналізу PARP

Аналіз PARP може включати аналіз генної експресії PARP, включаючи аналіз ДНК, РНК, аналіз рівня PARP та/чи аналіз активності PARP, включаючи рівень моно- та полі-ADP-рибозилування. Не обмежуючи обсяг даного винаходу, будь-яка кількість методик, відомих у

даних галузі, може використовуватися для аналізу PARP, та усі вони включені до обсягу даного винаходу. Деякі з прикладів таких методик виявлення висвітлюються нижче, але ці приклади жодним чином не обмежують різні методики виявлення, що можуть застосовуватися у даному винаході.

Аналіз профілю генної експресії: Методи аналізу профілю генної експресії включають методи, що ґрунтуються на аналізі гібридизації полінуклеотидів, полірібонуклеотидні методи, що ґрунтуються на секвентуванні полінуклеотидів, полірібонуклеотидні та протиомічні методи. Найбільш широко вживаними методами, відомими у даній галузі, для кількісного аналізу експресії мРНК у зразкові, є нозерн-блотинг та *in situ* гібридизація (Паркер та Барнс, Методи молекулярної біології 106:247-283 (1999)); аналіз шляхом захисту від РНКаз (Ход, Біометодики 13:852-854 (1992)); та методи на основі PCR, такі як зворотна ланцюгова реакція транскрипції полімерази (RT-PCR) (Вайс та інші, Тенденції у генетиці 8:263-264 (1992)). Альтернативно, можуть використовуватися антитіла, що розпізнають певні дуплекси, включаючи дуплекси ДНК, дуплекси РНК та гібридні дуплекси ДНК-РНК чи ДНК-білкові дуплекси. Репрезентативні методи аналізу генної експресії на основі секвентування включають Серійний аналіз генної експресії (SAGE) та аналіз генної експресії шляхом масивно-паралельного розпізнавального секвентування (MPSS), Компаративну гібридизацію геному (CGH), Хроматинову імунопреципітацію (ChIP), поліморфізм одного нуклеотиду (SNP) та аналізи SNP, Флуоресцентну *in situ* гібридизацію (FISH), аналізи зв'язування білку та аналіз за допомогою біочипу ДНК (також широко відомого як генний чи геномний чип, чип ДНК чи генний аналіз), аналіз за допомогою біочипів РНК.

Зворотна транскриптаза PCR (RT-PCR): Одним з найбільш чутливих та найбільш гнучких методів кількісного аналізу профілю генної експресії на основі PCR є RT-PCR, який може застосовуватися для порівняння рівнів мРНК у різних групах зразків, у нормальних та пухлинних тканинах, разом з медикаментозним лікуванням чи без нього, для того, щоб охарактеризувати форми генної експресії та провести різницю між близько пов'язаними мРНК, а також проаналізувати структуру РНК.

Перший етап передбачає ізолювання мРНК від зразка-мішені. Наприклад, вихідний матеріал може зазвичай бути повністю РНК ізолюваним від людської пухлини чи клітинних ліній пухлини, та відповідати нормальним тканинам чи клітинним лініям, відповідно. Таким чином, РНК може бути ізолюваною від різних нормальних та хворих клітин та тканин, наприклад пухлин, включаючи пухлини молочної залози, легенів, колоректальні пухлини, пухлини простати, мозку, печінки, нирок, підшлункової залози, селезінки, зобної залози, яєчок, яєчника, матки, тощо, чи клітині лінії пухлини. Якщо джерело мРНК є первинною пухлиною, мРНК може екстрагуватися, наприклад, із заморожених тканин чи тканин, що зберігаються у сховищі, наприклад, залиті у парафін чи зафіксовані (наприклад, зафіксовані у формаліні) тканини зразків.

Загальні методи екстракції мРНК є добре відомими у даній галузі та розкриваються у стандартних посібниках з молекулярної біології, включаючи Аусубель та інші, Поточні протоколи з молекулярної біології, Джон Вілей та сини (1997).

Зокрема, ізолювання РНК може здійснюватися за допомогою комплекту для очищення, комплекту буферів та протеази, що випускаються для вільного продажу на ринку, відповідно до інструкцій виробників. РНК, що була приготована з пухлини, може ізолюватися, наприклад, шляхом центрифугування в градієнтові щільності хлористого цезію. Оскільки РНК не може слугувати матрицею для PCR, перший етап аналізу профілю генної експресії за допомогою RT-PCR передбачає зворотну транскрипцію матриці РНК у сДНК, що супроводжується її експоненціальною ампліфікацією у реакції PCR. Двома найбільш широко вживаними зворотними транскриптазами є зворотна транскриптаза вірусу авіло мієлобластозу (AMV-RT) та зворотна транскриптаза вірусу лейкемії мишей Молоні (MMLV-RT). У якості стартового "зародку" для етапу зворотної транскрипції зазвичай застосовують спеціальні праймери, довільні гексамери чи оліго-dT праймери, залежно від обставин та цілі аналізу профілю експресії. Таким чином, похідна сДНК може використовуватися як матриця для наступної реакції PCR.

З метою мінімізації похибок та ефекту коливання від одного зразку до іншого, RT-PCR зазвичай виконується відповідно до внутрішнього стандарту. Ідеальний внутрішній стандарт виражається на постійному рівні серед різних тканин, та зазнає впливу комбінації умов експерименту. РНК, що найчастіше використовуються для нормалізації форм генної експресії, є мРНК для генів "домашнього господарства" гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (GAPDH) та β -актину.

Більш сучасним варіантом методики RT-PCR є кількісна PR у масштабі реального часу, яка вимірює акумулювання продукту PCR за допомогою флуорогенного зонду з подвійним

маркуванням. PCR у масштабі реального часу є сумісною як з кількісною конкурентною PCR, де внутрішній конкурент для кожної цільової послідовності використовується для нормалізації, так і з кількісною конкурентною PR, що використовує ген нормалізації, який міститься у зразкові чи ген ""домашнього господарства" для RT-PCR.

5 Флуоресцентна мікроскопія: Деякі варіанти винаходу включають флуоресцентну мікроскопію для аналізу PARP. Флуоресцентна мікроскопія забезпечує ідентифікацію молекулярного складу структур, що досліджуються, за допомогою флуоресцентно-маркованих зондів, що відзначаються високою хімічною специфічністю, таких як антитіла. Вона може здійснюватися шляхом безпосереднього з'єднання флуорофору з білком та їх зворотного введення у клітину. 10 Флуоресцентний аналог може поводити себе подібно природному білку та, таким чином, може слугувати для виявлення розподілу та поведінки цього білку у клітині. Разом з NMR, інфрачервоною спектроскопією, циркулярним дихроїзмом та іншими методиками, флуоресцентний розпад, притаманний білку та пов'язане з ним спостереження флуоресцентної анізотропії, зіштовхувальне гасіння та передача резонансної енергії є методиками для 15 виявлення білку. Природно-флуоресцентні білки можуть застосовуватися як флуоресцентні зонди. Кристалеві медузи (*aequorea victoria*) виробляють природно-флуоресцентний білок, відомий як, зелений флуоресцентний білок (GFP). Злиття цих флуоресцентних зондів з білком-мішенню забезпечує візуалізацію шляхом флуоресцентної мікроскопії та кількісного аналізу шляхом проточної цитометрії.

20 Тільки для прикладу, деякі з зондів є ярликами, такі як, флуоресцеїн та його похідні, карбоксифлуоресцеїни, родаміни та їх похідні, атто- ярлики, флуоресцентна червона та флуоресцентна жовтогаряча: ци3/ци5 альтернативи, комплекси лантанію з тривалим життєвим терміном, довгохвильові ярлики - до 800 нм, DY ціанінові ярлики та фікобіліпротеїни. Тільки для прикладу, деякі зонди є кон'югатами, такі як, ізотіоціанатні кон'югати, стрептавідінові 25 кон'югати та біотинові кон'югати. Тільки для прикладу, деякі зонди є субстратами ферменту, такі як флуорогенні та хромогенні субстрати. Тільки для прикладу, деякі зонди є флуорохромами, такі як FITC (зелена флуоресценція, збудження/емісія = 506/529 нм), родамін В (жовтогаряча флуоресценція, збудження/емісія = 560/584 нм), та нільська блакитна А (червона флуоресценція, збудження/емісія = 636/686 нм). Флуоресцентні наночастки можуть 30 використовуватися для різних видів імунологічного аналізу. Флуоресцентні наночастки ґрунтуються на різних матеріалах, таких як, поліакрилонітрил та полістирол тощо. Флуоресцентні молекулярні ротори є сенсорами мікросередовищного обмеження, що стають флуоресцентними, коли їх ротація є обмеженою. Декілька прикладів молекулярного обмеження включають посилений барвник (агрегація), що зв'язується з антитілами чи уловлюється під час 35 полімеризації актину. IEF (ізоелектричне фокусування) є аналітичним інструментом для відокремлення амфолітів, головним чином білків. Перевагою IEF-гелевого електрофорезу з флуоресцентним IEF-маркером є можливість безпосередньо споглядати формування градієнту. Флуоресцентний IEF-маркер також може виявлятися за допомогою ультрафіолетової абсорбції при 280 нм (20 °C).

40 Бібліотека пептидів може синтезуватися на твердих носіях та, використовуючи барвникові рецептори, послідовно забарвлені тверді носії можуть обиратися один за одним. Якщо рецептори не можуть вказати на певний колір, антитіла, що їх зв'язують, можуть бути забарвлені. Метод може застосовуватися не тільки на рецепторах білків, але також для 45 скринінгу лігандів, що зв'язують, синтезованих штучних рецепторів та скринінгу нових лігандів, що зв'язують метал, також. Автоматизовані методи для HTS та FACS (клітинний сортер з активацією флуоресценції) також можуть застосовуватися. Апарат FACS спочатку проганяє клітини через капілярну трубку та відокремлює клітини шляхом виявлення їх флуоресцентної інтенсивності.

Імунологічні дослідження: Деякі варіанти винаходу включають імунологічні дослідження з 50 метою аналізу PARP. При застосуванні імуноблотингу, такого як вестерн-блоттинг білків, відокремлених електрофорезом, окремий білок може бути ідентифікований за його антитілом. Імунологічний аналіз може бути імунологічним аналізом конкурентного зв'язування, де аналіт конкурує з маркованим антигеном за обмежений пул молекул антитіла (наприклад, радіоімунологічний аналіз, EMIT). Імунологічний аналіз може бути неконкуруючим, де антитіло 55 присутнє у надмірній кількості та є маркованим. При зростанні комплексу антигену аналіту, кількість маркованого комплексу антитіла-антигену також зростає (наприклад, ELISA). Антитіла можуть бути поліклональними, якщо продукуються шляхом ін'єкції антигену піддослідній тварині, чи моноклональними, якщо продукуються шляхом клітинного злиття та за допомогою методик культури клітин. При застосуванні імунологічного аналізу, антитіло може слугувати 60 спеціальним реагентом для антигену аналіту.

Не обмежуючи обсяг та зміст даного винаходу, деякі види імунологічного аналізу включають, тільки для прикладу, RIA (радіоімунологічний аналіз), імунологічні аналізи ферментів, такі як ELISA (ферментопов'язаний імуносорбентний аналіз), EMIT (ферментомультіплікований імунологічний метод), імуно-ферментативний аналіз з мікрочастками (MEIA), LIA (люмінесцентний імунологічний аналіз) та FIA (флуоресцентний імунологічний аналіз). Ці методи можуть застосовуватися для виявлення біологічних речовин у назальному зразкові. Антитіла, що використовуються як первинні, або як вторинні, можуть маркуватися радіоізотопами (наприклад, ^{125}I), флуоресцентними барвниками (наприклад, FITC) чи ферментами (наприклад, HRP чи AP), які можуть каталізувати флуорогенну чи люміногенну реакції.

Біотин чи вітамін H є коферментом, який наслідуює специфічну спорідненість з авідином та стрептавідином. Ця взаємодія робить біотинізовані пептиди корисним засобом у різних біотехнологічних дослідках для тестування якості та кількості. З метою покращення розпізнавання біотину/стрептавідину шляхом мінімізації стеричних перешкод, може знадобитися збільшення відстані між біотином та самим пептидом. Це може бути досягнуто шляхом приєднання молекули-ділника (наприклад, 6-нітрокапроєвої кислоти) між біотином та пептидом.

Аналіз кількісного визначення біотину для біотинізованих білків передбачає сенситивний флюорометричний аналіз з метою точного визначення кількості біоти нових ярликів у білку. Біотинізовані пептиди широко застосовуються у різних біомедичних системах скрінгу, що вимагають іммобілізації принаймні одного з взаємодіючих партнерів на кульках, мембранах, предметному склі чи титраційних мікропланшетах зі стрептавідиновим покриттям. Аналіз ґрунтується на зміщенні ліганду, маркованого блокатором флуоресцентного барвника, від ділянок реагенту, що зв'язують біотин. Для експонування певних груп біотину у кратно-маркованому білку, що є стерично-обмеженими та недоступними для реагенту, білок може оброблятися протеазою з метою перетравлення білку.

EMIT є імунологічним аналізом конкурентного зв'язування, який дозволяє уникнути звичного етапу відокремлення. Вид імунологічного аналізу, у якому білок є маркованим ферментом, та комплекс ферменту-білку-антитіла є ферментативно неактивним, дозволяє проводити кількісний аналіз немаркованого білку. Деякі варіанти винаходу включають метод ELISA з метою аналізу PARP. ELISA ґрунтується селективних антитілах, приєднаних до твердих носіїв, що комбінуються з ферментативними реакціями з метою утворення систем, здатних визначати низькі рівні білків. Цей метод є також відомим як імуно-ферментативний аналіз чи EIA. Білок визначається антитілами, що були утворені проти нього, тобто, для яких він є антигеном. Часто використовують моноклональні антитіла.

Тест може потребувати, щоб антитіла були зафіксовані на твердій поверхні, такий як внутрішня поверхня пробірки, та потребувати приготування таких самих антитіл, що приєднуються до ферменту. Фермент може бути таким (наприклад, β -галактозидаза), що продукує забарвлений продукт з безбарвного субстрату. Тест, наприклад, може виконуватися шляхом наповнення пробірки розчином антигену (наприклад, білком), що має аналізуватися. Будь-яка присутня молекула антигену може зв'язуватися з іммобілізованими молекулами антитіла. Кон'югат антитіла-ферменту може додаватися до реакційної суміші. Частина кон'югату, що містить антитіло, зв'язується з будь-якими молекулами антигену, які попередньо були зв'язані, створюючи "сендвіч" типу антитіло-антиген-антитіло. Після вимивання будь-якого незв'язаного кон'югату може додаватися розчин субстрату. По завершенню визначеного інтервалу, реакція зупиняється (наприклад, шляхом 1 N NaOH), а концентрація сформованого забарвленого продукту вимірюється за допомогою спектрофотометру. Інтенсивність забарвлення є пропорційною концентрації зв'язаного антигену.

Метод ELISA також може адаптуватися для вимірювання концентрації антитіл, при цьому, лунки для антитіл покриваються відповідним антигеном. Може додаватися розчин (наприклад, сироватка), що містить антитіло. По завершенню часу, достатнього для зв'язування з іммобілізованим антигеном, може додаватися фермент-кон'югований анти-імуноглобулін, що складається з антитіла проти антитіл, які піддаються тестуванню. Після вимивання реагенту, що не вступив у реакцію, може додаватися субстрат. Інтенсивність сформованого забарвлення є пропорційною кількості зв'язаних антитіл з маркованим ферментом (а отже концентрації антитіл, що аналізуються).

Деякі варіанти винаходу включають радіоімунологічний аналіз з метою аналізу PARP. Радіоактивні ізотопи можуть застосовуватися для дослідження *in vivo* метаболізму, розподілу та зв'язування незначної кількості сполук. Радіоактивні ізотопи ^1H , ^{12}C , ^{31}P , ^{32}S , та ^{127}I в організмі використовуються як ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , та ^{125}I . При застосуванні методу фіксації рецепторів на

планшеті на 96 лунок, рецептори можуть фіксуватися у кожній лунці з використанням антитіла чи хімічних методів, а радіоактивні марковані ліганди можуть додаватися до кожної лунки, щоб сприяти зв'язуванню. Незв'язані ліганди можуть вимиватися, після чого може визначатися стандарт за допомогою кількісного аналізу радіоактивності зв'язаних лігандів чи вимитих лігандів. Потім, додавання цільових сполук для скринінгу може спричиняти конкурентну реакцію зв'язування з рецепторами. Якщо сполуки відзначаються більшою спорідненістю з рецепторами ніж стандартні радіоактивні ліганди, більшість радіоактивних лігандів не буде зв'язуватися з рецепторами та може залишитися у розчині. Таким чином, шляхом аналізу кількості зв'язаних радіоактивних лігандів (чи вимитих лігандів) може бути визначена спорідненість сполук, що досліджуються, з рецепторами.

Метод мембранної фільтрації може знадобитися, коли рецептори не можуть бути зафіксовані на планшеті на 96 лунок чи, коли зв'язування лігандів потрібно виконувати у розчинній фазі. Іншими словами, після реакції зв'язування ліганду-рецептору у розчині, якщо реакційний розчин фільтрується через нітроцелюлозний фільтрувальний папір, дрібні молекули, включаючи ліганди, можуть пройти через нього та тільки рецептори білку можуть залишитися на папері. Тільки ліганди, що міцно зв'язані з рецепторами можуть залишатися на фільтрувальному папері, а відносна спорідненість доданих сполук може бути ідентифікована шляхом кількісного аналізу стандартних радіоактивних лігандів.

Деякі варіанти винаходу включають флуоресцентні імунологічні дослідження з метою аналізу PARP. Імунологічні методи на основі флуоресценції ґрунтуються на конкурентному зв'язуванні маркованих лігандів порівняно з немаркованими лігандами на високо-специфічних ділянках рецепторів. Флуоресцентна методика може застосовуватися для імунологічного аналізу на основі змін тривалості флуоресценції внаслідок зміни концентрації аналіту. Ця методика може працювати з барвниками, що мають коротку тривалість життєвого циклу, такими як флуоресцеїнізотіоціанат (FITC) (донор), чия флуоресценція може гаситися шляхом передачі енергії до еозину (акцептор). Можливе використання ряду фотолюмінісцентних сполук, таких як ціаніни, оксазини, тіазини, порфірини, фталоціаніни, флуоресцентні полінуклеарні ароматичні вуглеводні з інфрачервоним випромінюванням, фікобіліпротеїни, сквараїни та металоорганічні комплекси, вуглеводні та азобарвники.

Імунологічні методи на основі флуоресценції можуть бути, наприклад, гетерогенними чи гомогенними. Гетерогенні імунологічні аналізи передбачають фізичне відокремлення зв'язаного аналіту від вільного маркованого аналіту. Аналіт чи антитіло можуть фіксуватися на твердій поверхні. Методика може бути конкурентною (з метою більш високої селективності) чи неконкурентною (з метою більш високої чутливості). Виявлення може бути прямим (використовується тільки один тип антитіла) чи непрямим (використовується другий тип антитіла). Гомогенні імунологічні аналізи не передбачають фізичного відокремлення. Антиген з подвійним антитілом маркований флуорофором бере участь у реакції рівноваги з антитілами, направленими як проти антигену, так і проти флуорофору. Маркований та немаркований антиген мусять конкурувати за обмежену кількість анти-антигенних антитіл.

Деякі методи флуоресцентного імунологічного аналізу включають метод простого флуоресцентного маркування, флуоресцентну передачу резонансної енергії (FRET), флуоресценція з часовим дозволом (TRF), та скануюча зондова мікроскопія (SPM). Метод простого флуоресцентного маркування може застосовуватися для зв'язування рецепторів-лігандів, ферментативної активності шляхом використання відповідної флуоресценції, а також у якості флуоресцентного індикатора різних фізіологічних змін *in vivo*, таких як pH, іонна концентрація та електричний тиск. TRF є методом, що селективно вимірює флуоресценцію рядів лантанідів після завершення емісії інших флуоресцентних молекул. TRF може застосовуватися разом з FRET, а ряди лантанідів можуть ставати донорами або акцепторами. При застосуванні скануючої зондової мікроскопії, у фазі захоплення, наприклад, принаймні одне моноклональне антитіло приєднується до твердої фази, а скануючий зондовий мікроскоп використовується для виявлення комплексів антигену/антитіла, що можуть бути присутніми на поверхні твердої фази. Застосування скануючої тунельної мікроскопії усуває потребу в ярликах, що зазвичай використовуються у багатьох системах імунологічного аналізу для виявлення комплексів антигену/антитіла.

Методи ідентифікації білку: Тільки для прикладу, методи ідентифікації білку включають секвентування з низькою пропускнуою спроможністю на основі розщеплення за Едманом, методи мас-спектрометрії, мас-дактилоскопія пептидів, *de novo* секвентування, та аналіз на основі антитіла. Аналізи кількісного визначення білку включають фарбування гелю флуоресцентним барвником, методи маркування чи хімічної модифікації (наприклад, мітки спорідненості кодовані ізотопом (ICATS), комбінована фракційна діагональна хроматографія

(CRADIC)). Очищений білок також може використовуватися для визначення тривимірної кристалічної структури, що може застосовуватися для моделювання міжмолекулярних взаємодій. Загальноприйняті методи визначення тривимірної кристалічної структури включають рентгенівську кристалографію та NMR (ядерну магнітно-резонансну) спектроскопію. Індикативні характеристики тривимірної структури білків можуть зондуватися за допомогою мас-спектрометрії. Застосовуючи хімічне перехресне зшивання для з'єднання частин білку, що є близькими у просторі, але віддалени одне від одного у послідовності, можливо дійти до логічного висновку щодо інформації про загальну структуру. Шляхом наступного обміну протонів аміду з дейтерієм з розчинника, можливо прозондувати відкритість для розчинника різних частин білку.

У одному варіанті, клітинне сортування з флуоресцентною активацією (FACS) застосовується для визначення клітин з експресією PARP. FACS є спеціалізованим видом проточної цитометрії. Цей метод передбачає сортування гетерогенної суміші біологічних клітин у два чи більше контейнери, по одній клітині за раз, виходячи з конкретних характеристик кожної клітини щодо розсіювання світла та флуоресценції. Він передбачає кількісну реєстрацію флуоресцентних сигналів від окремих клітин, а також фізичне відокремлення клітин, що представляють особливий інтерес. У ще іншому варіанті, для оцінки експресії PARP використовуються мікрофлюїдальні пристрої.

Мас-спектрометрія також може застосовуватися для визначення характеристик PARP у зразкові пацієнта. Двома методами іонізації загальних білків є електроспреєва іонізація (ESI) та матрична лазерна десорбція/іонізація (MALDI). При застосуванні першого методу, білки іонізуються за допомогою будь-якої з двох вищеописаних методик, а потім вводяться в мас-спектрометр. При застосуванні другого методу, білки ферментативно перетравлюються на дрібніші пептиди з використанням агенту, такого як трипсин чи пепсин. Інші протеолітичні агенти перетравлення також застосовуються. Потім збір пептидних продуктів вводиться до мас-спектрометру. Цей спосіб часто називають "висхідним" підходом аналізу білку.

Мас-аналіз загального білку виконується з використанням або часоперелітних мас-спектрометрів (TOF) MS, або іонного циклотронного резонансу на основі перетворення Фур'є (FT-ICR). Інструментом, що використовується для мас-аналізу пептидів, є квадрупольна іонна пастка. Багатоступеневі квадрупольні часоперелітні та часоперелітні MALDI інструменти також знаходять своє застосування.

Використовуються два методи фракціонування білків, чи їх пептидних продуктів, отриманих шляхом ферментативного перетравлення. Перший метод передбачає фракціонування загальних білків та має назву двовимірний селевий електрофорез. Другий метод, високоефективна рідинна хроматографія, використовується для фракціонування пептидів після ферментативного перетравлення. У деяких ситуаціях, виникає потреба у комбінуванні обох цих методик.

Існує два шляхи, за допомогою яких, мас-спектроскопія може застосовуватися для ідентифікації білків. Маса пептидів використовує маси протеолітичних пептидів у якості вхідних даних для пошуку бази даних прогнозованих мас, що могли виникнути внаслідок перетравлення, з переліку відомих білків. Якщо послідовність білку у довідниковому переліку обумовлює значну величину прогнозованих мас, що відповідає експериментальним значенням, це дає певний доказ того, що цей білок є присутнім у оригінальному зразку.

Тандемна мас-спектрометрія (MS) також є методом ідентифікації білків. Дисоціація, індукована зштовхуваннями, використовується в основних способах застосування для генерування ряду фрагментів від конкретного іону пептиду. Процес фрагментації призводить до формування продуктів розщеплення, що розривають вздовж пептидні зв'язки.

Було описано цілий ряд різних алгоритмічних підходів для ідентифікації пептидів та білків за допомогою тандемної мас-спектрометрії (MS/MS), де ново секвентування пептидів та пошук на основі міток послідовності. Одним з варіантів, який поєднує в собі широкий діапазон характеристик аналізу даних є програмне забезпечення PEAKS. Інше існуюче аналітичне програмне забезпечення мас-спектрометрії включає: фінгерпринтинг фрагментів пептидів SEQUEST, Mascot, OMSSA та X!Tandem).

Білки також можуть кількісно визначатися за допомогою мас-спектрометрії. Зазвичай, стабільні (наприклад, нерадіоактивні) більш важкі ізотопи вуглецю (C^{13}) чи азоту (N^{15}) вводяться в один зразок, тоді як інший зразок маркується відповідними легкими ізотопами (наприклад, C^{12} та N^{14}). Перед проведенням аналізу два зразки змішуються. Пептиди, що походять від різних зразків можуть розрізнятися за різницею їх маси. Коефіцієнт їх пікової інтенсивності відповідає відносному коефіцієнту вмісту пептидів (та білків). До методів маркування ізотопів належать SILAC (маркування стабільних ізотопів амінокислотами у культурі клітин), маркування трипсин-каталізованим O^{18} , ICAT (маркування спорідненості кодованим

ізотопом), ITRAQ (ізотопні мітки для відносного та абсолютного кількісного обчислення). "Напівкількісна" мас-спектрометрія може здійснюватися без маркування зразків. Зазвичай, вона застосовується разом з аналізом MALDI (у лінійному режимі). Пікова інтенсивність, чи пікова ділянка, окремих молекул (зазвичай білків) корелюється з кількістю білку у зразкові. Проте, індивідуальний сигнал залежить від первинної структури білку, від складності зразка та від настройок інструменту.

Засоби N-кінцевого секвентування при ідентифікації невідомих білків підтверджують ідентичність та точність рекомбінантного білку (рамка зчитування, вихідне положення трансляції, тощо), допомагають інтерпретувати дані NMR та кристалографічні дані, демонструють ступені ідентичності між білками, чи забезпечують дані для розробки синтетичних пептидів для генерування антитіл, тощо. N-кінцеве секвентування використовує розщеплення за методом Едмана, послідовне видалення амінокислотних осадів з N-кінцевого домену білку та їх ідентифікація за допомогою зворотно-фазової рідинної хроматографії високого тиску (HPLC). Чутливість може бути на рівні 100s фемтомолів, а показники довгих послідовностей (20-40 осадів) можуть бути часто отримані з кількох 10s пікомолів вихідного матеріалу. Чисті білки (> 90 %) можуть генерувати дані, що піддаються простій інтерпретації, але недостатньо очищені білкові суміші також можуть містити корисні дані, що є предметом суворої інтерпретації даних. Білки з модифікованим N-кінцевим доменом (особливо ацетильовані) не можуть секвентуватися напряму, оскільки відсутність вільної первинної аміногрупи перешкоджає розщепленню за методом Едмана. Проте, обмежений протеоліз заблокованих білків (наприклад, з використанням бромціану) дозволяє генерувати суміш амінокислот у кожному циклі інструменту, що може бути предметом аналізу бази даних з метою інтерпретації багатозначної інформації щодо послідовності. C-кінцеве секвентування є посттрансляційною модифікацією, що впливає на структуру та активність білку. Різні стани хвороби можуть бути пов'язані з порушеннями процесингу білків, при цьому C-кінцеве секвентування є додатковим засобом дослідження структури білку та механізмів його процесингу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: експресія PARP1 у раку молочної залози IDC

Попередні дослідження засвідчили підвищену активність PARP при раку яєчника, печінково-клітинних карциномах та ректальних пухлинах, порівняно з нормальними здоровими контрольними зразками тканин, а також у людських лімфоцитах периферійної крові пацієнтів, хворих на лейкемію (Ялцинтепе Л, та інші Бразильський вісник медичних та біологічних досліджень 2005;38:361-5. Сінкс Н. та інші, Записи з питань раку 1991;58:131-5; Номура Ф, та інші, Вісник з гастроентерологічної гепатології 2000;15:529-35). Даний винахід використовує базу даних генної експресії для дослідження регулювання генів PARP1 на основі понад 2000 первинних злоякісних та нормальних людських тканин. Оскільки експресія та активність PARP1 є дуже низькою та однорідною у більшості нормальних людських тканин та органів, вона є підвищеною у відібраних пухлинних клітинах та первинних людських злоякісних новоутвореннях, при чому найбільш вражаюча різниця спостерігається при раку молочної залози, яєчника, легенів та матки (Фігура 1).

Зразки тканини

Зразки відбираються в рамках нормальної хірургічної процедури та миттєво заморожуються протягом 30 хвилин після резекції. Аналіз та підтвердження внутрішньої патології проводяться на зразках, що піддаються аналізу. Предметне скло, протравлене Гематоксиліном та еозином (H&E), готується з використанням суміжних тканин для підтвердження та класифікації діагностичних категорій та з метою оцінки неопластичної целюлярності. Експресія ER, PR та HER2 визначається за допомогою імуногістохімії та флуоресцентної *in situ* гібридизації. Ці результати, а також супровідна патологія та клінічні дані, ануються у відомості зразків та базах даних управління (бази даних Ascenta, BioExpress; "GeneLogic, Inc.", Гейтерсберг, штат Меріленд).

Аналіз профілю екстракції та експресії РНК

Екстракція та гібридизація РНК здійснюються як описано Ганзелем та іншими. Якість даних аналізу оцінюється за допомогою високопродуктивного прикладного програмного забезпечення (Ascenta, Bioexpress, "Gene Logic", Гейтерсберг, штат Меріленд та Affymetrix, "Santa Clara", штат Каліфорнія), яке оцінює дані відповідно до багатоцільових стандартів, включаючи коефіцієнт 5'/3' GAPDH, коефіцієнт сигналів/шумів та фон, а також інші додаткові показники. Аналіз за технологією GeneChip на мікрочипі виконується за допомогою програм Affymetrix Microarray Analysis Suite version 5.0, Data Mining Tool 2.0, та програмного забезпечення бази даних генних чипів (Affymetrix, "Santa Clara", штат Каліфорнія). Усі гени, представлені GeneChip є нормалізованими у світовому масштабі та масштабовані з інтенсивністю сигналу 100.

Аналіз даних генних чипів

Патологічно зразки нормальних тканин використовуються з метою визначення фонові експресії PARP1 мРНК. Розраховуються середні значення та 90 %, 95 %, 99 %, та 99.9 % верхніх довірчих меж (UCL) для індивідуальних прогнозованих значень. Оскільки ми

досліджуємо вірогідність знаходження окремих зразків, що є за межами нормальної множини, в рамках фонових розподілу, інтервал передбачення, а не довірчий інтервал для середнього значення, обирається для оцінки очікуваного діапазону майбутніх індивідуальних вимірювань.

Інтервал передбачення визначається за формулою, $\bar{X} \pm AS\sqrt{1+(1/n)}$, де \bar{X} є середнім значенням зразків нормальної молочної залози, S є стандартним відхиленням, n є розміром зразка, та A є 100(1-(p/2))^{-ий} процентиль t-розподілу Стюдента з n-1 ступенями свободи.

Патологічно зразки нормальних тканин використовуються з метою визначення фонові експресії PARP1. Зразки групуються у різні підкатегорії відповідно до характеристик, включаючи стадію пухлини, статус курця, статус CA125, чи вік. Кожен зразок пухлини оцінюється відповідно до 90 %, 95 %, 99 % чи 99.9 % UCL. Аналіз виконується за допомогою SAS v8.2 для Windows (www.sas.com).

Кореляції за Пірсоном розраховуються для 11 комплектів зондів у порівнянні з PARP1. Кореляції базуються на повному комплекті з 194 зразків. Кореляція Пірсона за змішаними моментами визначається за формулою,

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}},$$

де \bar{X} є середнім значенням комплексу зондів PARP1 та \bar{Y} є середнім значенням комплексу зондів, з якими корелюється PARP1. Статистична достовірність визначається за формулою,

$\frac{(n-2)^{1/2}r}{(1-r^2)^{1/2}}$, де r є кореляцією та n є кількістю зразків. Отримане значення вважається таким, що

має t-розподіл при n-2 ступенях свободи.

Зворотна ланцюгова реакція транскриптази-полімерази (RT-PCR):

Мультиплексна RT-PCR виконується з використанням 25 нг загальної РНК кожного зразка, як попередньо описано (Хан та інші, 2007). Мультиплексний аналіз, що застосовується для цього дослідження, призначається для виявлення РНК у зразках, залитих парафіном та зафіксованих у формаліні (FFPE) чи у заморожених тканинах. Концентрація РНК визначається за допомогою набору для кількісного визначення РНК RiboGreen ("Invitrogen") з багатофункціональним лічильником Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter. Зразок РНК від кожного зразка аналізується за допомогою біоаналізатора Agilent Bioanalyzer відповідно до інструкцій Agilent 2100 Bioanalyzer. Реакції зворотної транскрипції (RT) здійснюються, як попередньо описано, на обладнанні Applied Biosystems 9700. PCR реакції здійснюються на кожній сДНК за допомогою обладнання Applied Biosystems 9700. RT реакції розбавляються Канаміцин РНК для контролю ефективності реакцій RT та PCR. Види контролю, що застосовуються, включали позитивний контроль РНК, контроль відсутності матриці, контроль відсутності зворотної транскриптази. Реакції PCR аналізувалися за допомогою капілярного електрофорезу. Флуоресцентно-марковані реакції PCR розбавлялися, комбінувалися відповідно до стандартного розміру - 400 Genome Lab ("Beckman-Coulter"), денатурувалися та аналізувалися за допомогою Системи генетичного аналізу CEQ 8800 Genetic Analysis System. Експресія кожного гену-цілі відносно експресії β-глюкоронидази (GUSB) в межах однієї реакції реєструвалася як середнє значення та стандартне відхилення 3 незалежних оцінок для кожного зразка.

Пацієнти, хворі на рак молочної залози, що мають інвазивну внутрішньопротокову карциному (IDC), мали у 1.8 разів у середньому підвищену експресію PARP1 порівняно з нормальними тканинами молочної залози (P <.00001). Важливо, що гіперекспресія PARP1 найчастіше виникає у ракових тканинах молочної залози, що є негативними на ER, PR чи HER2 (Таблиця 1).

Таблиця 1

Гіперекспресія PARP1 у тканинах молочної залози IDC

| Підтип IDC | n | % зразків з гіперекспресією PARP1 |
|------------|-----|-----------------------------------|
| Нормальний | 68 | 2.9 % |
| IDC | 169 | 30.2 % |
| ER+ | 35 | 22.9 % |
| ER- | 18 | 55.6 % |
| PR+ | 26 | 23.1 % |
| PR- | 20 | 45.0 % |
| HER2+ | 24 | 29.2 % |
| HER2- | 10 | 70.0 % |
| ER+/PR+ | 26 | 23.1 % |
| ER-/PR- | 8 | 62.5 % |
| ER+/PR- | 8 | 25.0 % |

Гіперекспресія PARP1 визначалася зразками, у яких була перевищена верхня довірча межа 95% розподілу у нормальних тканинах молочної залози.

5 Приклад 2: Поєднання 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з хіміотерапією
Культура клітин

10 Клітини раку молочної залози було отримано від ATCC та культивовано у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium), що містило 10 % ембріональної сироватки телят. Клітини висівалися при нормі 10^5 клітин на чашку для культивування клітин P100 чи при 10^4 клітин на чашку для культивування клітин P60 у присутності сполук у різних концентраціях чи контролю DMSO. Після обробки, кількість приєднаних клітин вимірювалася за допомогою лічильника Культера (Coulter), та шляхом фарбування 1 % метиленовим синім. Метиленовий синій розчинявся у 50 %-50 % суміші Метанолу та води. Клітини висівалися на планшет на 24 чи 96 лунок та оброблялися, як

15 планувалося, середовище аспірували, клітини промивали PBS, фіксованим у метанолі протягом 5-10 хвилин, метанол аспірували, а планшетам давали можливість повністю висохнути. Розчин метиленового синього додавався до лунок та планшети інкубували протягом 5 хвилин. Фарбувальний розчин видалявся, а планшети промивалися dH₂O до втрати синього кольору. Після повного висушування планшетів, незначна кількість 1N HCl додавалася до кожної лунки

20 для екстрагування метиленового синього. Зчитування показників OD при 600 нм та калібрувальна крива використовувалися для визначення кількості клітин.

Сполуки

25 Сполуки розчинялися безпосередньо з сухого порошку в 10 мМ маточного розчину в DMSO для кожного окремого експерименту. Контрольні експерименти виконувалися з відповідним об'ємом/концентрацією носія (DMSO); у цих контрольних дослідах, клітини не демонстрували змін у своєму рості чи розподілі клітинного циклу.

Аналіз шляхом виключання з PI, аналіз клітинного циклу та метод TUNEL

30 Після додавання препаратів та інкубації, клітини трипсинізувалися та аліквотні зразки відбиралися для підрахунку та аналізу шляхом виключення з PI (Пропідій йодидом). Одна частина клітин центрифугувалася та ресуспендувалася у 0.5 мл холодного як крига PBS, що містив 5 мкг/мл PI. Інша частина клітин фіксувалася у холодному як крига 70 % етанолі та зберігалася у холодильнику протягом ночі. Для аналізу клітинного циклу, клітини фарбувалися пропідій йодидом (PI) відповідно до стандартних процедур. Клітинний вміст ДНК визначався за допомогою проточної цитометрії з використанням BD LSRII FACS, та визначався відсоток клітин

35 у G1, S чи G2/M з використанням програмного забезпечення ModFit.

40 Клітини маркувалися для апоптозу з використанням "Набору для виявлення in Situ некрозу клітин, Флуоресціну" (корпорація "Roche Diagnostics Corporation", "Roche Applied Science", Індіанapolis, штат Індіана). Стисло, фіксовані клітини центрифугувалися та промивалися раз фізіологічним розчином з фосфатним буфером (PBS), що містив 1 % альбумину бичачої сироватки (BSA), потім ресуспендувалися у 2 мл буферу для пермеабілізації (0.1 % Тритон X-100 та 0.1 % натрію цитрат у PBS) протягом 25 хвилин при кімнатній температурі та двічі промивалися у 0.2 мл PBS/1 % BSA. Клітини ресуспендувалися у 50 мкл реакційної суміші TUNEL (TdT фермент та маркувальний розчин) та інкубувалися протягом 60 хвилин при 37 °C у зволоженій затіненій атмосфері в інкубаторі. Марковані клітини промивалися раз у PBS/1 %

BSA, потім ресуспендувалися у 0.5 мл крижаного PBS, що містив 1 мкг/мл 4',6-діамідіно-2-феніліндолу (DAPI) протягом принаймні 30 хвилин. Усі зразки клітин аналізувалися з використанням BD LSR II ("BD Biosciences", Сан Хосе, штат Каліфорнія).

Аналіз маркуванням Бромдезоксипіридином (BrdU)

- 5 50 мкл BrdU ("Sigma Chemical Co.", Сент-Луїс, штат Міссурі) маточного розчину (1 mM) додавалося, щоб отримати кінцеву концентрацію 10 мкМ BrdU. Клітини інкубувалися протягом 30 хвилин при 37 °C та фіксувалися у холодному як крига 70 % етанолі та зберігалися у прохолодній кімнаті (4 °C) протягом ночі. Фіксовані клітини центрифугувалися та промивалися раз у 2 мл PBS, потім ресуспендувалися у 0.7 мл розчину для денатурації (0.2 мг/мл пепсину в 2 N HCl) протягом 15 хвилин при 37 °C у темряві та суспендувалися з 1.04 мл 1M Tris буферу (Trizma base, "Sigma Chemical Co.") та промивалися у 2 мл PBS. Потім клітини ресуспендувалися у 100-мкл анти-BrdU антитіла ("DakoCytomation", Карпінтерія, штат Каліфорнія) з 1:100 розчиненням у TBFP проникному буфері (0.5 % Tween-20, 1 % альбумину бичачої сироватки та 1 % ембріональної сироватки телят у PBS) та інкубувалися протягом 25 хвилин при кімнатній температурі у темряві та промивалися у 2 мл PBS. Первинні клітини з маркованими антитілами ресуспендувалися у 100 мкл Алекса Флуору F(ab')₂ фрагменті козячих анти-мишачих антитіл IgG (H+L) (2 мг/мл) ("Molecular Probes", Юджин, штат Орегон) з 1:200 розчиненням у TBFP проникному буфері та інкубувалися протягом 25 хвилин при кімнатній температурі у темряві та промивалися у 2 мл PBS, потім ресуспендувалися у 0.5 мл крижаного PBS, що містив 1 мкг/мл 4',6-діамідіно-2-феніліндолу (DAPI) протягом принаймні 30 хвилин. Усі зразки клітин аналізувалися з використанням BD LSR II ("BD Biosciences", Сан Хосе, штат Каліфорнія).

- 25 Комбінації 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з різними хіміотерапевтичними агентами тестувалися на моделях раку *in vitro* та *in vivo*. Дослідження BA у поєднанні з гемцитабіном чи карбоплатином у клітинній лінії з аденокарциномою молочної залози MDA-MB-468, взятої у пацієнта з метастатичною тричі негативною аденокарциномою, засвідчили, що BA потенціює зупинку клітинного циклу S- та G2/M та посилює цитотоксичні ефекти, які спричиняє або карбоплатин, або гемцитабін (Фігура 2).

- 30 BA активність у поєднанні з гемцитабіном та карбоплатином оцінювалася на моделі ксенотрансплантату людської тричі негативної метастатичної карциноми молочної залози MDA-MB-231 у безтимусних ("голих") мишей лінії nu/nu. BA підвищує активність комбінації гемцитабіну та карбоплатину та призводить у результаті до 4 часткових відгуків (PR) та 2 повних відгуків (CR) та 1 виживання без пухлини (TFS) через 35 днів після прийому препаратів (Таблиця 2). Комбінація BA з гемцитабіном та карбоплатином добре переситься.

35

Таблиця 2

Активність BA *in vivo* у поєднанні з гемцитабіном/карбоплатином на моделі ксенотрансплантату людської тричі негативної метастатичної аденокарциноми молочної залози MDA-MB-231

| Лікування | Частковий відгук | Повний відгук | Виживання без пухлини |
|---|------------------|---------------|-----------------------|
| Контроль | 0 | 0 | 0 |
| Гемцитабін (15 мг/кг; ip; q3dx4 ip) + карбоплатин (10 мг/кг; ip; qwx3) | 4 | 0 | 0 |
| BSI-201 (50 мг/кг; ip; biwk) + Гемцитабін (15 мг/кг; ip; q3dx4 ip) + карбоплатин (10 мг/кг; ip; qwx3) | 4 | 2 | 1 |

Таким чином, 4-йодо-3-нітробензамід (BA) може потенціювати активність різних цитотоксичних хіміотерапевтичних агентів, включаючи карбоплатин та гемцитабін.

Приклад 3: Поєднання 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з іринотеканом

- 40 Клітини раку молочної залози було отримано від ATCC та культивовано у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM)), що містило 10 % ембріональної сироватки телят. Клітини висівалися при нормі 10⁵ клітин на чашку для культивування клітин P100 чи при 10⁴ клітин на чашку для культивування клітин P60 у присутності сполук у різних концентраціях чи контролю DMSO. Після обробки, кількість приєднаних клітини вимірювалася за допомогою лічильника
- 45 Культиера, та шляхом фарбування 1 % метиленовим синім. Метиленовий синій розчинявся у 50 %-50 % суміші Метанолу та води. Клітини висівалися на планшет на 24 чи 96 лунок та оброблялися, як планувалося, середовище аспірували, клітини промивали PBS, фіксованим у метанолі протягом 5-10 хвилин, метанол аспірували, а планшетами давали можливість повністю

висохнути. Розчин метиленового синього додавався до лунок та планшети інкубували протягом 5 хвилин. Фарбувальний розчин видалявся, а планшети промивалися dH₂O до втрати синього кольору. Після повного висушування планшетів, незначна кількість 1N HCl додавалася до кожної лунки для екстрагування метиленового синього. Зчитування показників OD при 600 нм та калібрувальна крива використовувалися для визначення кількості клітин.

Сполуки розчинялися безпосередньо з сухого порошку в 10 мМ маточного розчину в DMSO для кожного окремого експерименту. Контрольні експерименти виконувалися з відповідним об'ємом/концентрацією носія (DMSO); у цих контрольних дослідах, клітини не демонстрували змін у своєму рості чи розподілі клітинного циклу.

Аналіз шляхом виключання з PI, аналіз клітинного циклу та метод TUNEL, а також аналіз маркуванням BrdU виконувалися як описано вище у Прикладі 2.

Комбінації у різних концентраціях 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з іринотеканом тестувалися на моделях раку *in vitro*. Дослідження BA у поєднанні з іринотеканом у клітинній лінії з тричі негативною аденокарциномою молочної залози MDA-MB-468, взятої у пацієнта з метастатичною тричі негативною аденокарциномою, засвідчили, що BA потенціює зупинку клітинного циклу S- та G2/M та посилює цитотоксичні ефекти, які спричиняє іринотекан (Таблиця 3).

Таблиця 3

Регулювання клітинного циклу тричі негативною карциномою молочної залози MDA-MB-468, що лікується 4-йодо-3-нітробензамідом (BA) у поєднанні з іринотеканом

| | G1 | S | G2/M | Життєздатні клітини, % контролю |
|-----------------------|-------|-------|-------|---------------------------------|
| Іринотекан | | | | |
| Іринотекан 0 нМ+BA нМ | | | | |
| 0 | 64.40 | 24.18 | 11.42 | 100.0 |
| 50 | 65.50 | 23.48 | 11.02 | 91.5 |
| 100 | 57.72 | 26.93 | 15.34 | 67.5 |
| Іринотекан 5 нМ+BA нМ | | | | |
| 0 | 38.17 | 33.77 | 28.05 | 48.6 |
| 50 | 24.94 | 41.85 | 33.21 | 31.6 |
| 100 | 9.28 | 51.43 | 39.29 | 23.4 |

Таким чином, 4-йодо-3-нітробензамід (BA) може потенціювати активність різних цитотоксичних хімотерапевтичних агентів, включаючи карбоплатин, гемцитабін та іринотекан.

Приклад 4: Поєднання 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з інгібітором IGF1R Picropodophyllin (PPP)

Клітини раку молочної залози було отримано від ATCC та культивовано у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM), що містило 10 % ембріональної сироватки телят. Клітини висівалися при нормі 10⁵ клітин на чашку для культивування клітин P100 чи при 10⁴ клітин на чашку для культивування клітин P60 у присутності сполук у різних концентраціях чи контролю DMSO. Після обробки, кількість приєднаних клітин вимірювалася за допомогою лічильника Культера, та шляхом фарбування 1 % метиленовим синім. Метиленовий синій розчинявся у 50 %-50 % суміші метанолу та води. Клітини висівалися на планшет на 24 чи 96 лунок та оброблялися, як планувалося, середовище аспірували, клітини промивали PBS, фіксованим у метанолі на 5-10 хвилин, метанол аспірували, а планшетами давали можливість повністю висохнути. Розчин метиленового синього додавався до лунок та планшети інкубували протягом 5 хвилин. Фарбувальний розчин видалявся, а планшети промивалися dH₂O до втрати синього кольору. Після повного висушування планшетів, незначна кількість 1N HCl додавалася до кожної лунки для екстрагування метиленового синього. Зчитування показників OD при 600 нм та калібрувальна крива використовувалися для визначення кількості клітин.

Сполуки безпосередньо з сухого порошку в 10 мМ маточного розчину в DMSO для кожного окремого експерименту. Контрольні експерименти виконувалися з відповідним об'ємом / концентрацією носія (DMSO); у цих контрольних дослідах, клітини не демонстрували змін у своєму рості чи розподілі клітинного циклу.

Аналіз шляхом виключання з PI, аналіз клітинного циклу та метод TUNEL, а також аналіз маркуванням BrdU виконувалися як описано вище у Прикладі 2.

Комбінації у різних концентраціях 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з інгібітором рецептору

- інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1R) Picropodophyllin (PPP) тестувалися на моделях раку in vitro. Дослідження BA у поєднанні з PPP у клітинній лінії з тричі негативною аденокарциномою молочної залози MDA-MB-468, взятої у пацієнта з метастатичною тричі негативною аденокарциномою, засвідчили, що BA потенціює зупинку клітинного циклу S- та G2/M та посилює цитотоксичні ефекти, які спричиняє PPP (Таблиця 4).

Таблиця 4

Регулювання клітинного циклу тричі негативною карциномою молочної залози MDA-MB-468, що лікується 4-йодо-3-нітробензамідом (BA) у поєднанні з інгібітором IGF1R Picropodophyllin (PPP)

| | G1 | S | G2/M | Життєздатні клітини, % контролю |
|---------------------|-------|-------|-------|------------------------------------|
| PPP 0 нМ + 201 нМ | | | | |
| 0 | 50.96 | 30.37 | 16.04 | 100 |
| 50 | 50.20 | 31.34 | 15.21 | 82 |
| 100 | 40.63 | 34.52 | 20.16 | 61 |
| PPP 200 нМ + 201 нМ | | | | |
| 0 | 51.42 | 30.22 | 15.01 | 89 |
| 50 | 49.75 | 31.41 | 15.10 | 77 |
| 100 | 37.51 | 35.58 | 21.30 | 59 |
| PPP 400 нМ + 201 нМ | | | | |
| 0 | 37.29 | 25.32 | 20.17 | 60 |
| 50 | 32.88 | 28.47 | 22.37 | 42 |
| 100 | 23.62 | 31.78 | 29.98 | 32 |

Таким чином, 4-йодо-3-нітробензамід (BA) може потенціювати активність цільових інгібіторів рецептору фактору росту, включаючи picropodophyllin (PPP).

Приклад 5: Лікування тричі негативного раку молочної залози з використанням BA

Було проведено багатоцільове, відкрите, рандомізоване дослідження з метою демонстрації терапевтичної ефективності лікування тричі негативного метастатичного раку молочної залози з використанням 4-йодо-3-нітробензаміду (BA).

Цілі дослідження: основні цілі цього дослідження є наступними:

Показник клінічної ефективності (CBR=CR+PR+SD \geq 6 місяців): Визначити, що BA забезпечує CBR 30 % чи вище порівняно з CBR 45 %, що відноситься до лікування з використанням гемцитабіну та карбоплатину.

- Також дослідити безпечність та переносимість BA

- Другорядні цілі цього дослідження є наступними:

- Загальний показник відгуку (ORR)

- Показник виживання без прогресування (PFS)

- Оцінка токсичності що кожної групи пацієнтів

- Дослідницькі цілі цього дослідження є наступними:

- Охарактеризувати інгібування активності PARP за допомогою BA

- Охарактеризувати активність PARP у ретроспективних зразках тканин пухлини

- Дослідити стан BRCA у тричі негативному раці молочної залози

- Дослідити відгук у пацієнтів, які мають рак та відомі мутації BRCA порівняно з пацієнтами без таких мутацій

- Класифікувати тканини раку молочної залози або як базальні, або люмінальні

Модель дослідження: відкрите, рандомізоване дослідження безпечності та ефективності з двома групами, що охоплюють 90 пацієнтів (45 у кожній групі), які будуть випадковим чином відібрані або у:

- Групу дослідження 1: Гемцитабін (1000 мг/м²; вливання комплектом IV протягом 30 хвилин) та Карбоплатин (AUC 2; вливання комплектом IV протягом 60 хвилин) на 1 та 8 дні 21-денного циклу; чи

- Групу дослідження 2: 4-йодо-3-нітробензамід (4 мг/кг вливання комплектом IV протягом 1 години) на 1, 4, 8 та 11 дні кожного 21-денного циклу

- Пацієнти відібрані до Групи дослідження 2 будуть виключатися з дослідження в разі прогресування хвороби

- Перехресна зміна: Пацієнти, відібрані до Групи дослідження 1, можуть переводитися на

продовження лікування гемцитабіном/карбоплатином у поєднанні з 4-йодо-3-нітробензамідом в разі прогресування хвороби

- Обсяг вибірки: до 90 осіб, до 45 у кожній групі беруть участь у дослідженні. Пацієнти будуть випадковим чином поділені по 45 осіб на Групу-1 чи Групу-2.

5 Цільова група:

- Критерії включення:

- Вік принаймні 18 років

- Метастатичний рак молочної залози (Стадія IV), з можливістю виміру відповідно до критеріїв RECIST

10 - 0-2 попередні курси хіміотерапії в рамках режиму лікування при метастатичних формах. Попередня ад'ювантна/неoad'ювантна терапія допускається.

- Дані гістології (або первинні, або метастатичні ділянки) раку молочної залози, що є ER-негативним, PR-негативним та HER-2 негіперекспресивним відповідно до імуногістохімії (0, 1) чи не є генноампліфікованим відповідно до аналізу FISH, що виконувався на первинній пухлині чи метастатичному новоутворенні.

- Завершення попередньої хіміотерапії принаймні за 3 тижні до початку дослідження.

- Пацієнти могли отримувати терапію в рамках ад'ювантного режиму чи режиму лікування при метастатичних формах, проте в разі прийому бісфосфонатів, форми з раком кісток не повинні братися для дослідження прогресування чи відгуку.

20 - Променева терапія повинна бути завершена принаймні за 2 тижні до початку дослідження, а опромінені пухлини не повинні застосовуватися у якості хвороб для виміру.

- Пацієнти можуть метастази центральної нервової системи (CNS), за умови стабілізації (відсутні прояви прогресування) протягом принаймні 3 місяців після застосування місцевої терапії

25 - Загальний стан хворих за шкалою ECOG 0-1

- Адекватність функціонування органів визначена як: абсолютна кількість нейтрофілів (ANC) більше чи дорівнює $1,5000/\text{мм}^3$, кількість тромбоцитів більше чи дорівнює $100,000/\text{мм}^3$, кліренс креатиніну більше ніж 50 мл/хв., рівні амінотрансфераз ALT та AST нижче ніж 2.5 x верхньої межі норми (ULN) (чи нижче ніж 5 x ULN у випадку метастаз печінки); загальний білірубін нижче 1.5 мг/дл.

30 - Для дослідження PARP рекомендується мати блок тканини, проте участь пацієнтів не виключається.

- Вагітні чи жінки, які годують груддю, виключаються. Жінки, здатні до дітонародження, повинні мати документально підтверджений негативний тест на вагітність протягом двох тижнів від початку дослідження та дати згоду на прийняття застосування контрацептивів протягом тривалості дослідної терапії

35 - Підписана, затверджена експертною радою медичного закладу (IRB) документально оформлена добровільна згода на участь у дослідженні

Критерії виключення:

40 - Патологічні новоутворення, що піддаються ідентифікації тільки методом PET томографії

- Більш ніж 2 попередніх курси хіміотерапії (включаючи ад'ювантну). Послідовні курси такі як АС-паклітаксел розглядаються як один курс.

- Отримали попереднє лікування гемцитабіном, карбоплатином, цисплатином чи 4-йодо-3-нітробензамідом.

45 - Важливі медичні показання, що можуть вплинути на участь у дослідженні (неконтрольовані легенева, ниркова чи печінкова дисфункції, неконтрольована інфекція).

- Значна історія неконтрольованої серцевої хвороби; наприклад, неконтрольований підвищений кров'яний тиск, нестабільна стенокардія, нещодавно перенесений інфаркт міокарду (протягом попередніх 6 місяців), неконтрольована застійна серцева недостатність та кардіоміопатія, що є або симптоматичною, або безсимптомною, але з пониженою фракцією викиду менше ніж 45 %.

- Інший важливий супутній стан, який на думку дослідника, може вплинути на ефективність та безпечність участі у дослідженні.

55 - Особа бере участь в іншому клінічному випробуванні медикаментозних препаратів, чи приймає інші агенти, що проходять клінічні випробування

- Паралельна чи попередня (протягом 7 днів з 1 дня дослідження) антикоагулянт на терапія (мала доза для підтримки необхідного рівня допускається)

- Визначені види супутнього лікування

- Паралельна променева терапія не дозволяється протягом тривалості дослідження

60 - Неможливість дотримання вимог дослідження

- Скринінг-тести та аналіз будуть виконуватися тільки після отримання від особи підписаної, затвердженої експертною радою медичного закладу (IRB) документально оформленої добровільної згоди на участь у дослідженні. Процедури будуть виконуватися протягом 14 днів від прийому дози (день 1), якщо інше не має іншого застереження.

5 Клінічне дослідження: Повна історія, медичний огляд, стан за шкалою ECOG, зріст, вага, основні показники стану організму та документування супутніх видів лікування.

Лабораторні дослідження: Гематологія (з диференціалом, підрахунком ретикулоцитів та тромбоцитів); протромбіновий час (PT) та частковий протромбіновий час (PTT); загальна хімічна панель (натрій, калій, хлорид, CO₂, креатинін, кальцій, фосфор, магній, BUN, сечова кислота, альбінін, AST, ALT, лужна фосфатаза, загальний білірубін та холестерин, HDL та LDL), аналіз сечі з мікроскопічним дослідженням, інгібування PARP у PBMC, сироваткова проба чи сечовий тест на вагітність для жінок, здатних до дітонародження. Аналіз профілю BRCA буде отримано, за умови підпису документально оформленої згоди. Ця інформація також може бути взята з особистої медичної картки. Клінічна стадійність: комп'ютерна томографія (CT) для хвороб, що
10 піддаються виміру чи магнітний резонанс (MRI).

Лікування: Обрані пацієнти залучаються до дослідження та випадковим чином розподіляються до Групи 1 чи Групи 2:

- Група дослідження 1: Гемцитабін (1000 мг/м²; вливання комплектом IV протягом 30 хвилин) та Карбоплатин (AUC 2; вливання комплектом IV протягом 60 хвилин) на 1 та 8 дні 21-денного циклу; чи
20

- Група дослідження 2: 4-йодо-3-нітробензамід (4 мг/кг, вливання комплектом IV протягом 1 години) на 1, 4, 8 та 11 дні кожного 21-денного циклу.

- Перехресна зміна: Пацієнти, відібрані до Групи дослідження 1, можуть переводитися на продовження лікування гемцитабіном/карбоплатином у поєднанні з 4-йодо-3-нітробензамідом на час прогресування хвороби.
25

- Тести до введення дози та після введення дози будуть виконуватися як визначено у протоколі дослідження.

- Дозування для обох груп лікування буде повторюватися через 21-денні цикли.

Пацієнти можуть брати участь у цьому дослідженні до тих пір, поки у них не виникне непереносимість до препарату чи прогресування хвороби чи вони відкликають свою згоду на участь. Особи, які досягнуть повного відгуку (CR) отримають додаткові 4 цикли. Особи, які припинять лікування раніше часткового відгуку (PR), мають проходити регулярне обстеження з метою визначення стадійності відповідно до протоколу до настання PD. Після того як пацієнт припинить лікування, оцінка виживання без прогресування та загальний показник відгуку (клінічної ефективності) будуть виконуватися з 3-місячними інтервалами до моменту прогресування хвороби чи смерті.
30

Перше планове вимірювання відгуку пухлини для хвороби з проявами, що піддаються вимірюванню, буде проводитися після циклу 2, а потім кожні інші цикли терапії (приблизно кожні 6-8 тижнів) у доповнення до початкового визначення стадійності, здійснюється в межах базового аналізу. Відгук пухлини відповідно до Критеріїв оцінки модифікованого відгуку солідних пухлин (RECIST) буде використовуватися для визначення прогресування хвороби шляхом CT чи MRI (має використовуватися та сама методика, що й для скринінгу).
40

Завершення лікування: Усі пацієнти мали пройти завершувальні лікувальні процедури, як описано у протоколі, що складається не пізніше ніж через 30 днів після прийому останньої дози 4-йодо-3-нітробензаміду. Крім того, щодо усіх осіб буде проведено оцінку загального відгуку пухлини шляхом клінічної томографії, якщо така оцінка не проводилася протягом 30 днів до прийому останньої дози 4-йодо-3-нітробензаміду.
45

Оцінка безпечності: Безпечність буде оцінюватися за допомогою стандартних клінічних та лабораторних тестів (гематологія, хімічний склад крові та аналіз сечі). Ступінь токсичності визначається відповідно до системи CTCAE v3.0. Національного інституту раку.
50

Фармакокінетика / Фармакодинаміка

Зразки крові для аналізу РК та фармакодинаміки будуть отримані тільки від осіб, які включено до групи дослідження 2, яка включає пацієнтів з перехресною зміною препаратів.

Зразки РК будуть відбиратися протягом циклу 1, до прийому дози та відразу по завершенні вливання на 1 та 11 дні.
55

Зразки для фармакодинаміки чи PARP будуть відбиратися протягом циклу 1, до прийому дози у 1, 4, 8 та 11 дні. Зразки після прийому дози тільки у 1 день.

Центри, в яких не можливо зібрати зразки для РК чи фармакодинаміки, як зазначено, будуть допущені до участі у дослідженні, а у протокол будуть внесені відповідні зміни щодо цих центрів.
60

Ефективність: Оцінка стану пухлини буде здійснюватися стандартними методами (наприклад, СТ) перед початком дослідження та потім приблизно кожні 6-8 тижнів за відсутності клінічно підтвердженого прогресування хвороби.

Статистичні методи

5 Основна ціль дослідження передбачає проведення оцінки показника клінічної ефективності (CBR) у групі, що приймає ВА. У кожній з двох груп дослідження буде оцінюватися основний кінцевий критерій ефективності (CBR), та розраховуватися точний біноміальний 90 % довірчий інтервал. Показники CBR у двох групах будуть порівнюватися за допомогою одностороннього точного критерію Фішера з 5 % рівнем достовірності. Другорядні та дослідницькі критерії оцінки ефективності будуть оцінювати виживання без прогресування та загальне виживання, а 95 % довірчі інтервали будуть розраховуватися за допомогою методу Каплана-Мейєра. Розподіл показників виживання без прогресування та загального виживання у двох групах дослідження буде порівнюватися за допомогою логарифмічного рангового критерію. Аналіз даних щодо інгібування PARP матиме дослідницький та описовий характер за своєю природою.

10 15 Стосовно кінцевого критерію безпечності, дані щодо побічних ефектів (AE) та тяжких побічних ефектів (SAE) будуть представлені у таблиці для кожної групи дослідження, відповідно до системно-органного класу та умов, яким надається перевага. Результати лабораторних досліджень після першого циклу будуть резюмовані з метою визначення змін порівняно з вихідними значеннями.

20 Супроводжувальний нагляд: На 90 день та кожні 90 днів (± 20 днів) після прийому останньої дози дослідного препарату буде здійснюватися збір супровідної інформації.

Лабораторні дослідження - зразки крові та сечі для гематології, хімічного аналізу сироватки та аналіз сечі будуть готуватися відповідно до стандартних процедур. Панелі лабораторних досліджень визначені наступним чином:

25 Гематологія: підрахунок лейкоцитів (WBC) з диференціалом, підрахунок еритроцитів (RBC), визначення гемоглобіну, гематокриту та тромбоцитів

Хімічний аналіз сироватки: албумин, ALP, ALT, AST, BUN, кальцій, двоокис вуглецю, хлорид, креатинін, γ -глутаміл трансфераза, глюкоза, лактатдегідрогеназа, фосфор, калій, натрій, загальний білірубін та загальний білок.

30 Аналіз сечі: зовнішній вигляд, колір, pH, питома вага, кетони, білок, глюкоза, білірубін, нітрит, уробіліноген та прихована кровотеча (мікроскопічний аналіз осаду буде виконуватися, якщо результати експрес-аналізу сечі є позитивними).

Фармакокінетичні зразки крові будуть відбиратися тільки від осіб, яких включено до групи дослідження 2 або які переводяться до групи дослідження 2. Зразки будуть відбиратися безпосередньо перед прийомом дози та відразу по завершенні кожного вливання протягом циклу 1 на 1 та 11 дні дослідження.

35

Біомаркери є індикаторами, що об'єктивно вимірюються та оцінюються, біологічних процесів, патогенних процесів чи фармакологічних відгуків на терапевтичне втручання. В онкології особливий інтерес викликають молекулярні зміни, що лежать в основі онкогенних процесів, які можуть ідентифікувати підтипи раку, стадії хвороби, оцінити показник росту пухлини чи прогнозувати прогресування хвороби, метастазів та відгуків на лікування ВА.

40

Функціональна активність PARP перед та після лікування ВА буде визначатися шляхом аналізу активності PARP у периферійних мононуклеарних клітинах крові (PMBC). PMBC будуть готуватися з 5 мл зразків крові відповідно до процедур, детально описаних у посібнику дослідження, та активність/інгібування PARP буде вимірюватися.

45

Для довідки щодо усіх зразків PARP кожен центр отримає посібник дослідження, що містить детальний опис процедур відбору, обробки та транспортування зразків.

Генний аналіз раку молочної залози (BRCA) являє собою аналіз крові з метою перевірки на предмет специфічних змін (мутацій) у генах (BRCA1 та BRCA2), які допомагають контролювати нормальний ріст клітин. У жінок, які мають мутації BRCA, відзначалося від 36 % до 85 % вірогідності розвитку раку молочної залози та між 16 % та 60 % вірогідності розвитку раку яєчника. Призначення інгібітору PARP жінкам з мутацією BRCA має підтвердити свою користь. Це дослідження є першою спробою з метою визначення будь-якого зв'язку між станом BRCA та відгуком на лікування препаратом ВА.

50

55 Для виконання цього завдання, стан BRCA повинен визначатися (якщо не був раніше відомим) для всіх осіб. Пацієнт, що беру участь у дослідженні, має підписати окрему форму документально оформленої згоди. Оскільки цей компонент не належить до критеріїв включення у дослідження, потенційні учасники, які відмовляються від цього виду тестування не будуть виключені з участі у цьому дослідженні лише з цієї причини.

60 У кожній з двох груп дослідження буде оцінюватися основний кінцевий критерій

ефективності (CBR), та розраховуватися точний біноміальний 90 % довірчий інтервал. Показники CBR у двох групах будуть порівнюватися за допомогою одностороннього точного критерію Фішера з 5 % рівнем достовірності. Другорядні та дослідницькі критерії оцінки ефективності виживання без прогресування та загального виживання у двох групах будуть порівнюватися з використанням логарифмічного рангового критерію.

Дані щодо відгуку пухлини будуть реєструватися описово у формі списків усіх осіб, включених до вибірки з метою оцінки безпечності, для визначення, чи мало лікування препаратом ВА клінічний ефект, що піддається вимірюванню, (наприклад, час до прогресування), та має виконуватися через перших 8 тижнів. Дані щодо відгуку будуть поділятися за категоріями відповідно до критеріїв RECIST.

Аналіз даних щодо інгібування PARP матиме дослідницький та описовий характер за своєю природою. Буде виконуватися статистичне групове порівняння на предмет різниці в інгібуванні PARP та будь-яких фармакогеномних результатів (наприклад, BRCA) у зразках, відібраних до початку, під час та після лікування препаратом ВА.

Аналізи безпечності будуть виконуватися щодо усіх пацієнтів, які отримали принаймні 1 дозу ВА.

ВА, що застосовується у дослідженні, буде готуватися у 10 мг/мл концентрації, що містить 25 % гідроксилпропілбетациклодекстрину у 10 мМ фосфатному буфері (pH 7.4).

Критерії оцінки відгуку солідних пухлин (RECIST):

Критерії включення

Тільки пацієнти, які мають хворобу з проявами, що піддаються вимірюванню до початку дослідження, мають включатися до протоколу, що передбачає дослідження відгуку пухлини у якості основного кінцевого критерію оцінки.

Хвороба з проявами, що піддаються вимірюванню, передбачає наявність принаймні одного новоутворення, що піддається вимірюванню. Якщо хвороба з проявами, що піддаються вимірюванню, обмежується одним єдиним новоутворенням, її неопластична природа має бути підтверджена цитологією/гістологією.

Новоутворення, що піддаються вимірюванню, є новоутвореннями, що можуть точно вимірюватися принаймні в одному вимірі з найдовшим діаметром ≥ 20 мм за допомогою традиційних способів чи ≥ 10 мм шляхом спірального сканування СТ.

Новоутворення, що не піддаються вимірюванню, - усі інші утворення, включаючи невеликі новоутворення (найдовший діаметр < 20 мм з використанням традиційних способів чи < 10 мм шляхом спірального сканування СТ), наприклад, ураження кісток, лептоменінгеальна хвороба, асцит, плевральний випіт/ексудативний перикардит, набряково-інфільтративний мастит молочної залози, поверхневий/легеневий лімфангіт, кіста, а також черевні маси, що не є підтвердженими та супроводжуються томографічною діагностикою; та.

Усі вимірювання мають здійснюватися та реєструватися у метричній системі з використанням лінійки чи циркулів. Усі первинні оцінки мають здійснюватися якомога ближче до початку лікування та ніколи більш ніж за 4 тижні до початку лікування.

Однаковий спосіб оцінки та однакова методика мають застосовуватися з метою охарактеризувати кожне ідентифіковане та заявлене новоутворення перед початком дослідження та під час супроводжувального нагляду.

Клінічні новоутворення будуть вважатися такими, що піддаються вимірюванню, тільки за умови, що вони є поверхневими (наприклад, вузли на шкірі та лімфовузли, що пальпуються). Щодо новоутворень на шкірі рекомендується ведення документації з кольоровими фотографіями, включаючи масштабну лінійку для оцінки розміру утворення.

Методи вимірювання

СТ та MRI є найкращими наявними на сьогоднішній день та відтворюваними методами вимірювання цільових новоутворень, що обираються для оцінки відгуку. Традиційні методи СТ та MRI мають виконуватися на зрізах 10 мм чи менше по товщині зрізу у контакт. Спіральна комп'ютерна томографія СТ має виконуватися з використанням 5 мм алгоритму суміжної реконструкції. Це стосується пухлин грудної клітини, черевної порожнини та тазу. Пухлини голови та шиї та пухлини кінцівок зазвичай вимагають складання спеціальних протоколів.

Новоутворення на рентгенівських знімках грудної клітини є прийнятними як утворення, що піддаються вимірюванню, якщо вони є чітко означені та оточені насиченими кров'ю легенями. Проте, перевага надається СТ.

Якщо основним кінцевим критерієм оцінки дослідження є оцінка об'єктивного відгуку, ультразвук (US) не повинен застосовуватися для вимірювання пухлинних новоутворень. Він є, проте, можливою альтернативою клінічним вимірюванням поверхневих лімфовузлів, що пальпуються, підшкірних уражень та щитовидних вузлів. Ультразвук також може бути корисним

для підтвердження повного зникнення поверхневих новоутворень, що зазвичай оцінюються шляхом клінічних досліджень.

Застосування ендоскопії та лапароскопії для оцінки об'єктивного відгуку пухлини ще не було повною мірою та широко підтверджено. Їх застосування у цьому конкретному контексті потребує складного експерименту та високого рівня експертної ї, що можна знайти лише у деяких центрах. Таким чином, використання цих методів для оцінки об'єктивного відгуку пухлини має бути обмежено цілями підтвердження можливості застосування у спеціалізованих центрах. Проте, такі методики можуть бути корисними для підтвердження повної патоморфологічної регресії (відгуку) при отриманні біопсій.

Самі тільки маркери пухлини не можуть використовуватися для оцінки відгуку. Якщо маркери від початку були вищі за верхню межу норми, вони повинні нормалізуватися для того, щоб пацієнт вважався таким, який має повний клінічний відгук після зникнення усіх пухлин.

Цитологія та гістологія можуть застосовуватися для диференціації між PR та CR у рідкісних випадках (наприклад, після лікування з метою відрізнити остаточні доброякісні утворення від остаточних злоякісних утворень у пухлинах, що належать до типу герміногенних пухлин).

Вихідна первинна документація "Цільові" та "Нецільові" новоутворення

Усі новоутворення, що піддаються вимірюванню, максимум до п'яти новоутворень на орган та 10 новоутворень загалом, що представляють усі уражені органи, мають бути ідентифіковані як цільові новоутворення, підлягають документуванню та вимірюванню до початку дослідження.

Цільові новоутворення мають обиратися на основі їх розміру (новоутворення з найдовшим діаметром) та їх придатності до здійснення точних повторюваних вимірювань (або шляхом томографічних методів чи клінічно).

Сума найдовшого діаметру (LD) для всіх цільових новоутворень буде розраховуватися та документуватися як вихідна сума LD. Вихідна сума LD буде застосовуватися як довідниковий показник, за допомогою якого буде охарактеризована пухлина, що є об'єктом дослідження.

Усі інші новоутворення (чи ділянки хвороби) мають бути ідентифіковані як нецільові новоутворення та також мають документуватися до початку дослідження. Вимірювання цих новоутворень не вимагається, але наявність чи відсутність кожного з них має нотуватися під час супроводжувального нагляду.

Критерії відгуку

Оцінка цільових новоутворень:

- Повний відгук (CR): Зникнення усіх цільових новоутворень

- Частковий відгук (PR): Принаймні 30 % зменшення суми LD цільових новоутворень порівняно з довідниковим показником вихідної (до початку дослідження) суми найдовшого діаметру LD

- Прогресуюча хвороба (PD): Принаймні 20 % збільшення суми LD цільових новоутворень порівняно з довідниковим показником, за який береться найменша сума LD, зареєстрована від початку лікування чи виникнення одного чи більше нових новоутворень

- Стабілізація хвороби (SD): ні зменшення, достатнього щоб відповідати частковому відгуку (PR), ні збільшення, достатнього щоб відповідати прогресуючій хворобі (PR), порівняно з довідниковим показником, за який береться найменша сума LD, зареєстрована від початку лікування

Оцінка нецільових новоутворень:

- Повний відгук (CR): Зникнення усіх нецільових новоутворень та нормалізація рівня маркеру пухлини

- Неповний відгук / Стабілізація хвороби (SD): Збереження одного чи більше нецільових новоутворень чи/та збереження рівня маркеру пухлини вище нормальних меж

- Прогресуюча хвороба (PD): Виникнення одного чи більше нових утворень та/чи однозначне прогресування існуючих нецільових утворень (1)

- Хоча однозначне прогресування "нецільового" новоутворення є тільки винятковим, за таких обставин, думка лікуючого терапевта має превалювати, а стан прогресування має бути пізніше підтверджено повторним аналізом (чи дослідною кафедрою).

Оцінка найкращого загального відгуку

Найкращий загальний відгук є найкращим відгуком, який було зареєстровано від початку лікування до прогресування/рецидиву хвороби (з урахуванням довідникового показника для PD, за який беруться найменші вимірювання, зареєстровані від початку лікування). Загалом, присвоєння пацієнтові найкращого відгуку буде залежати від досягнення як вимірювань, так і критеріїв підтвердження.

| Цільові новоутворення | Нецільові новоутворення | Нові утворення | Загальний відгук |
|-----------------------|-------------------------|----------------|------------------|
| CR | CR | відсутні | CR |
| CR | Неповний відгук/SD | відсутні | PR |
| PR | не-PD | відсутні | PR |
| SD | не-PD | відсутні | SD |
| PD | будь-які | так чи ні | PD |
| будь-які | PD | так чи ні | PD |
| будь-які | будь-які | так | PD |

Пацієнти з загальним погіршенням стану здоров'я, що вимагають припинення лікування без об'єктивних доказів прогресування хвороби на даний момент часу, мають бути класифіковані як такі, які мають "симптоматичне погіршення." Необхідно вжити усіх можливих зусиль, щоб задокументувати об'єктивне прогресування навіть після припинення лікування.

За деяких обставин може бути складно відрізнити остаточну хворобу від нормальної тканини. Коли оцінка повного відгуку залежить від цього визначення, рекомендується дослідити остаточне утворення (отримання матеріалу шляхом аспірації тонкою голкою/біопсія) з метою підтвердження статусу повного відгуку.

Підтвердження

Основна ціль підтвердження об'єктивного відгуку полягає у недопущенні переоцінки отриманого показника відгуку. У випадках, коли підтвердження відгуку є недосяжним, слід чітко вказати при підготовці звіту про результати подібних досліджень, що відгуки є непідтвердженими.

Щоб отримати статус PR чи CR, зміни у вимірах пухлини повинні бути підтверджені повторними оцінками, що мають виконуватися не менше ніж через 4 тижні після того, критерії відгуку були досягнуті вперше. Більші інтервали, якщо вони визначені протоколом дослідження, також можуть бути прийнятними.

У випадку стабілізації хвороби (SD), супроводжувальні вимірювання повинні підтвердити критерії SD принаймні один раз після початку дослідження з мінімальним інтервалом (загалом, не менше ніж 6-8 тижнів), як визначено у протоколі дослідження.

Тривалість загального відгуку

Тривалість загального відгуку вимірюється від часу, коли були досягнуті критерії вимірювання для CR чи PR (незалежно від того, який статус був зареєстрований першим) до першої дати коли рецидив чи PD були об'єктивно задокументовані з урахуванням довідникового показника для PD, за який беруться найменші виміри, зареєстровані від початку лікування.

Тривалість стабілізації хвороби

Стабілізація хвороби (SD) вимірюється від початку лікування до виникнення критеріїв для прогресування хвороби, при цьому у якості довідникового значення беруть найменші виміри, зареєстровані від початку лікування.

Клінічна відповідність тривалості SD варіюється залежно від типу та стадії пухлини. Таким чином, наполегливо рекомендується, щоб протокол визначав інтервали мінімального часу, необхідного між двома вимірюваннями з метою визначення SD. Цей інтервал часу має враховувати очікувану клінічну користь від такого стану для учасників дослідження.

Аналіз відгуку

Для досліджень, у яких показник відгуку є основним кінцевим критерієм, наполегливо рекомендується, щоб після завершення дослідження усі відгуки аналізувалися експертами, які є незалежними від дослідження. Найкращим підходом є одночасний перегляд карток пацієнтів та рентгенівських знімків.

Звітування про результати

Усі пацієнти, включені у дослідження, мають оцінюватися щодо відгуку на лікування, навіть за наявності серйозних відхилень від протокольного лікування чи їх невідповідності критеріям включення. Кожен пацієнт буде розподілятися за однією з наступних категорій: 1) повний відгук, 2) частковий відгук, 3) стабілізація хвороби, 4) прогресуюча хвороба, 5) передчасна смерть внаслідок злоякісної хвороби, 6) передчасна смерть внаслідок інтоксикації, 7) передчасна смерть з іншої причини, чи 9) невідома причина (не піддається оцінці, недостатні дані).

Усі пацієнти, які відповідають критеріям включення, мають бути включені у основний аналіз показника відгуку. Пацієнти, віднесені до категорій відгуку 4-9, мають вважатися такими, які не мали відгуку на лікування (прогресування хвороби). Таким чином, неправильний режим лікування чи неправильне призначення ліків не призводять до виключення з аналізу показника відгуку. Точні визначення категорій 4-9 будуть відповідати визначенням протоколу.

Усі висновки мають ґрунтуватися на усіх пацієнтах, включених до участі у дослідженні

Субаналізи мають виконуватися на основі підгрупи пацієнтів, за виключенням тих, щодо яких були ідентифіковані значні відхилення від протоколу (наприклад, передчасна смерть з інших причин, передчасне припинення лікування, серйозні порушення протоколу, тощо). Проте, такі субаналізи не повинні слугувати основою для формулювання висновків щодо ефективності лікування, а причини виключення пацієнтів з аналізу мають чітко зазначатися.

Необхідно забезпечити 95 % довірчі інтервали.

Приклад 6: Лікування раку молочної залози з використанням ВА

Фаза 1b, відкритого дослідження зі збільшенням дози оцінює безпечність ВА (2.0, 2.8, 4.0, 5.6, 8.0 та 11.2 мг/кг) у поєднанні з хіміотерапевтичними курсами (топотекан, гемцитабін, темозоломід та карбоплатин + паклітаксел) у осіб з прогресуючими пухлинами молочної залози. Оцінка РВМС у пацієнтів засвідчує значне та тривале інгібування PARP після прийому багатократних доз ВА по 2.8 мг/кг чи більше (Фігура 3).

Була ідентифікована добра переносимість комбінації ВА з кожним цитотоксичним режимом. Будь-які види виявленої токсичності відповідають відомим та прогнозованим побічним ефектам кожного хіміотерапевтичного курсу. Відсутні докази того, що додавання ВА до будь-якого з випробуваних цитотоксичних режимів або посилює відомі види токсичності, або підвищує частоту очікуваної токсичності цих режимів. Була ідентифікована біологічно доречна доза (2.8 мг/кг), що призводить до значного та тривалого інгібування PARP при ефективних преклінічних концентраціях у крові. Приблизно 80 % осіб демонстрували ознаки стабілізації хвороби за 2 цикли лікування чи більше, засвідчуючи потенційну клінічну користь.

Приклад 7: Фаза 2 дослідження метастатичного тричі негативного раку молочної залози (TNBC) з використанням ВА окремо чи у поєднанні ВА з Гемцитабіном/Карбоплатином

Фаза 2 відкритого, рандомізованого за 2 групами дослідження безпечності та ефективності вивчає, чи інгібування активності PARP шляхом поєднання ВА з гемцитабіном/карбоплатином у пацієнтів, хворих на метастатичний рак молочної залози TNBC, покращує показник клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців) порівняно з окремою стандартною хіміотерапією. Гіпотеза, що піддається тестуванню, виходить з того, що додавання ВА до гемцитабіну/карбоплатину буде сприяти досягненню показника CBR 60 % порівняно з 45 %, що досягаються при застосуванні самого гемцитабіну/карбоплатину у пацієнтів, хворих на рак TNBC.

Критерії оцінки

Кінцеві критерії оцінки

- Показник клінічної ефективності ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ місяців)

- Безпечність та переносимість ВА

Другорядні критерії оцінки

- Загальний показник відгуку (ORR)

- Показник виживання без прогресування (PFS)

Дослідницькі критерії оцінки

- Характеристика генної експресії PARP та фармакогеноміки на основі зразків тканини пухлин з банку зразків

- Стан BRCA

- Відгук у пацієнтів, які мають рак та відомі мутації BRCA порівняно з пацієнтами без таких мутацій

- Класифікація тканини молочної залози як базальної або люмінальної

Доза/режим

Пацієнти відбиралися випадковим чином у співвідношенні 1:1 до:

Групи дослідження 1: Гемцитабін (1000 мг/м²; вливання комплектом IV протягом 30 хвилин) + Карбоплатин (AUC 2; вливання комплектом IV протягом 60 хвилин) на 1 та 8 дні 21-денного циклу

Групи дослідження 2: Гемцитабін (1000 мг/м²; вливання комплектом IV протягом 30 хвилин) + Карбоплатин (AUC 2; вливання комплектом IV протягом 60 хвилин) на 1 та 8 дні + ВА (5.6 мг/кг вливання комплектом IV протягом 1 години) на 1, 4, 8, та 11 дні 21-денного циклу

Усі цикли дозування повторювалися кожних 21 дні.

Пацієнти, відібрані випадковим чином до групи дослідження 2, виключалися з дослідження в разі прогресування хвороби. Пацієнти, відібрані випадковим чином до групи дослідження 1 переводилися на перехресний прийом ВА у поєднанні з гемцитабіном/карбоплатином в разі прогресування хвороби.

Ключові критерії відбору

- Метастатичний рак молочної залози (Стадія IV) з можливістю виміру відповідно до

критеріїв RECIST

- 0-2 попередні курси хіміотерапії в рамках режиму лікування при метастатичних формах, попередня ад'ювантна /неoad'ювантна терапія допускається

5 - Дані гістології (або первинні, або метастатичні ділянки) раку молочної залози, що є ER-негативним, PR-негативним та HER-2 негіперекспресивним відповідно до імуногістохімії (0, 1) чи не є генноампліфікованим відповідно до аналізу FISH

- Стан за шкалою ECOG 0-1

Група дослідження

На сьогоднішній день було залучено 85 пацієнтів у 23 дослідних центрах (Таблиця 5).

10

Таблиця 5

Демографічні показники щодо пацієнтів Фази II дослідження

| | | Група А: гемцитабін/карбоплатин | Група В: BSI-201 + гемцитабін/карбоплатин |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| n | | 43 | 42 |
| Вік (років) | Середній (діапазон) | 51 (32-80) | 54 (35-68) |
| Стать | Чоловіча Жіноча | 0 (0 %) 43 (100 %) | 0 (0 %) 42 (100 %) |
| Раса | Біла Негроїдна Невідома | 29 (67 %) 8 (19 %) 6 (14 %) | 32 (76 %) 6 (14 %) 4 (10 %) |
| Попередні курси хіміотерапії* | Неoad'ювантна | 5 | 4 |
| | 0 | 5 | 3 |
| | 1 | 18 | 13 |
| | 2 | 7 | 13 |
| | 3 | 1 | 0 |

* на основі наявних даних.

Аналіз профілю експресії ER, PR та HER2

15 Включення у дослідження ґрунтується на традиційному гістологічному тестуванні у дослідницькому центрі. Залиті парафіном зрізи оригінальних тканин, отриманих шляхом біопсії у пацієнтів, залучених до дослідження, та таких, що характеризують статус генів, що є маркерами TNBC, включаючи ER, PR, HER2, а також PARP1, Top2A, та Ki-67. Метод базується на оптимізованій мультиплексній кількісній RT-PCR з метою кількісної оцінки генної експресії у зразках тканин, залитих парафіном та зафіксованих у формаліні (FFPE). Клінічні зразки дослідження порівнюються з незалежно отриманими контрольними зразками, представляють нормальні та пухлинні тканини FFPE. Крім того, серія зразків була отримана від пацієнтів, що задокументовані як такі, хто мають гіперекспресію HER2.

Зразки тканини

25 Зразки відбираються в рамках нормальної хірургічної процедури та миттєво заморожуються протягом 30 хвилин після резекції. Аналіз та підтвердження внутрішньої патології проводяться на зразках, що піддаються аналізу. Предметне скло, протравлене Гематоксиліном та еозином (H&E), готується з використанням суміжних тканин для підтвердження та класифікації діагностичних категорій та з метою оцінки неопластичної целюлярності. Експресія ER, PR та HER2 визначається за допомогою імуногістохімії та флуоресцентної in situ гібридизації. Ці результати, а також супровідна патологія та клінічні дані, ануються у відомості зразків та базах даних управління (бази даних Ascenta, BioExpress; "GeneLogic, Inc.", Гейтерсберг, штат Меріленд).

Аналіз профілю екстракції та експресії РНК

35 Екстракція та гібридизація РНК здійснюються як описано Ганзелем та іншими. Якість даних аналізу оцінюється за допомогою високопродуктивного прикладного програмного забезпечення (Ascenta, Bioexpress, "Gene Logic", Гейтерсберг, штат Меріленд та Affymetrix, "Santa Clara", штат Каліфорнія), яке оцінює дані відповідно до багатоцільових стандартів, включаючи коефіцієнт 5'/3' GAPDH, коефіцієнт сигналів/шумів та фон, а також інші додаткові показники. Аналіз за

технологією GeneChip на мікрочипі виконується за допомогою програм Affymetrix Microarray Analysis Suite version 5.0, Data Mining Tool 2.0, та програмного забезпечення бази даних генних чипів (Affymetrix, "Santa Clara", штат Каліфорнія). Усі гени, представлені GeneChip є нормалізованими у світовому масштабі та масштабовані з інтенсивністю сигналу 100.

5 Аналіз даних генних чипів

Патологічно зразки нормальних тканин використовуються з метою визначення фонові експресії PARP1 мРНК. Розраховуються середні значення та 90 %, 95 %, 99 %, та 99.9 % верхніх довірчих меж (UCL) для індивідуальних прогнозованих значень. Оскільки ми досліджуємо вірогідність знаходження окремих зразків, що є за межами нормальної множини, в рамках фонового розподілу, інтервал передбачення, а не довірчий інтервал для середнього значення, обирається для оцінки очікуваного діапазону майбутніх індивідуальних вимірювань.

Інтервал передбачення визначається за формулою, $\bar{X} \pm AS\sqrt{1 + (1/n)}$, де \bar{X} є середнім значенням зразків нормальної молочної залози, S є стандартним відхиленням, n є розміром зразка, та A є $100(1-(p/2))$ -ий процентиль t-розподілу Стюдента з n-1 ступенями свободи.

15 Патологічно зразки нормальних тканин використовуються з метою визначення фонові експресії PARP1. Зразки групуються у різні підкатегорії відповідно до характеристик, включаючи стадію пухлини, статус курця, статус CA125, чи вік. Кожен зразок пухлини оцінюється відповідно до 90 %, 95 %, 99 % чи 99.9 % UCL. Аналіз виконується за допомогою SAS v8.2 для Windows (www.sas.com).

20 Кореляції за Пірсоном розраховуються для 11 комплектів зондів у порівнянні з PARP1. Кореляції базуються на повному комплекті з 194 зразків. Кореляція Пірсона за змішаними

моментами визначається за формулою,
$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}},$$

де \bar{x} є середнім значенням комплекту зондів PARP1 та \bar{y} є середнім значенням комплекту зондів, з якими корелюється PARP1. Статистична достовірність визначається за формулою,

25 $\frac{(n-2)^{1/2}r}{(1-r^2)^{1/2}}$, де r є кореляцією та n є кількістю зразків. Отримане значення вважається таким, що

має t-розподіл при n-2 ступенях свободи

Мультиплексна зворотна ланцюгова реакція транскриптази-полімерази (RT-PCR):

Мультиплексна RT-PCR виконується з використанням 25 нг загальної РНК кожного зразка, як попередньо описано (Хан та інші, 2007). Мультиплексний аналіз, що застосовується для цього дослідження, призначається для виявлення РНК у зразках, залитих парафіном та зафіксованих у формаліні (FFPE) чи у заморожених тканинах. Концентрація РНК визначається за допомогою набору для кількісного визначення РНК RiboGreen ("Invitrogen") з багатофункціональним лічильником Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter. Зразок РНК від кожного зразка аналізується за допомогою біоаналізатора Agilent Bioanalyzer відповідно до інструкцій Agilent 2100 Bioanalyzer. Реакції зворотної транскрипції (RT) здійснюються, як попередньо описано, на обладнанні Applied Biosystems 9700. PCR реакції здійснюються на кожній сДНК за допомогою обладнання Applied Biosystems 9700. RT реакції розбавляються Канаміцин РНК для контролю ефективності реакцій RT та PCR. Види контролю, що застосовуються, включали позитивний контроль РНК, контроль відсутності матриці, контроль відсутності зворотної транскриптази. Реакції PCR аналізувалися за допомогою капілярного електрофорезу. Флуоресцентно-марковані реакції PCR розбавлялися, комбінувалися відповідно до стандартного розміру-400 Genome Lab ("Beckman-Coulter"), денатурувалися та аналізувалися за допомогою Системи генетичного аналізу CEQ 8800 Genetic Analysis System. Експресія кожного гену-цілі відносно експресії β-глюкоронидази (GUSB) в межах однієї реакції реєструвалася як середнє значення та стандартне відхилення 3 незалежних оцінок для кожного зразка.

Фігура 4 ілюструє результати щодо перших 50 пацієнтів, включених у дослідження. Оскільки класифікація пацієнтів як "тричі негативних" ґрунтується на результатах ER, PR та HER2 з використанням стандартної клінічної методології, ці результати свідчать, що генна експресія ER та PR є в обох випадках низькою порівняно з нормальною тканиною. Експресія HER2 є порівнянною з нормальною та відрізняється від пацієнтів, у яких генна гіперекспресія PARP1 є значно підвищеною, підтверджуючи наше попереднє спостереження.

Попередні результати

Безпечність

55 Скорочення доза, у відсотковій кількості пацієнтів зі скороченнями та загальної кількості скорочень, є подібними в обох групах (Таблиця 6).

Таблиця 6

Скорочення доз

| | Група А: гемцитабін/карбоплатин | Група В: BSI-201 + гемцитабін/карбоплатин |
|--|------------------------------------|--|
| Пацієнти зі скороченнями дози, n з N (%) | 15/39 (38.5 %) | 11/39 (28.2 %) |
| Загальна кількість скорочень | 20 | 19 |

Скорочення гемцитабіну/карбоплатину відповідно до визначення у алгоритмі протоколу.

У групі, що отримувала тільки хіміотерапію, 15 з 39 осіб (38.9 %) мали скорочення дози, а у групі дослідження, що отримувала ВА + хіміотерапію, 11 з 39 осіб (28.2 %) мали скорочення дози. У цілому є 20 випадків скорочення дози у групі, що приймає гемцитабін/карбоплатин, та 19 у групі, що приймає ВА + гемцитабін/карбоплатин. Враховуючи, що у групі В було призначено приблизно у три рази більше доз порівняно з групою А, факт безпечності додавання ВА до гемцитабіну/карбоплатину додатково підкріплюється.

Оцінка побічних ефектів (АЕ) свідчить, що дві групи дослідження є порівнянними (коефіцієнт ризику = 1.0, без поправки на загальний час дослідження; Таблиця 7).

Таблиця 7

Побічні ефекти

| Системно-органный клас | Група А (гемцитабін/карбоплатин) n=33 | | | | | Група В (гемцитабін/ карбоплатин + BSI-201) N=23 | | | | |
|--|---|----|----|----|--------|--|----|----|----|--------|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | Усього | G1 | G2 | G3 | G4 | Усього |
| Порушення з боку кровоносної та лімфатичної системи | 1 | 3 | 12 | 9 | 25 | 3 | 2 | 11 | 4 | 20 |
| Розлади серцевої діяльності | | 2 | | | 2 | 1 | | | | 1 |
| Порушення з боку органа слуху та рівноваги | 1 | | | | 1 | 1 | 1 | | | 1 |
| Порушення ендокринної системи | | | | | 0 | 1 | 1 | | | 2 |
| Порушення з боку органа зору | 2 | | | | 2 | 5 | | | | 5 |
| Розлади шлунково-кишкового тракту | 16 | 10 | 1 | | 27 | 14 | 8 | | | 22 |
| Ускладнення зального характеру та реакції в місці введення | 11 | 8 | 4 | | 23 | 11 | 7 | | | 18 |
| Порушення з боку печінки та жовчовивідних шляхів | 1 | | 1 | | 2 | | 1 | | | 1 |
| Порушення з боку імунної системи | | 1 | | | 1 | 2 | 1 | | | 3 |
| Інфекційні та паразитарні захворювання | 8 | 6 | | | 14 | 8 | 5 | | | 13 |
| Травми, отруєння та ускладнення, викликані проведенням дослідних процедур | 1 | 3 | | | 4 | 1 | | | | 1 |
| Лабораторні та інструментальні дані | 3 | 3 | 1 | | 7 | 4 | 1 | 2 | | 7 |
| Порушення з боку обміну речовин та харчування | 10 | 2 | 2 | | 14 | 4 | 1 | | | 5 |
| Порушення з боку м'язово-скелетної та з'єднувальної тканини | 9 | 8 | 2 | | 19 | 6 | 1 | 1 | | 8 |
| Доброякісні, злоякісні та нез'ясовані новоутворення, включаючи кісти та поліпи | | 1 | | | 1 | | | 1 | | 1 |

Продовження таблиці 7

| Системно-органный клас | Група А (гемцитабін/карбоплатин) n=33 | | | | | Група В (гемцитабін/ карбоплатин + BSI-201) N=23 | | | | |
|---|---|----|----|----|--------|--|----|----|----|--------|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | Усього | G1 | G2 | G3 | G4 | Усього |
| Порушення з боку нервової системи | 5 | 6 | 3 | | 14 | 8 | 5 | | | 13 |
| Порушення психіки | 5 | 2 | | | 7 | 4 | 2 | | | 6 |
| Порушення щ. боку нирок та сечовивідних шляхів | 4 | 2 | | | 6 | 4 | | | | 4 |
| Порушення з боку репродуктивної системи та молочної залози | 2 | | | | 2 | 1 | | | | 1 |
| Порушення з боку дихальної системи, органів грудної клітини та середньостіння | 13 | 5 | 2 | | 20 | 4 | 2 | | | 6 |
| Порушення з боку шкіри та підшкірних тканин | 9 | 6 | | | 15 | 7 | 1 | | | 8 |
| Хірургічні та терапевтичні процедури | | | 1 | | 1 | 2 | | | | 2 |
| Порушення з боку судинної системи | 6 | 2 | | | 8 | 2 | | | | 2 |
| УСЬОГО | 107 | 70 | 29 | 9 | 215 | 93 | 39 | 15 | 4 | 151 |
| Коефіцієнт ризику | | | | | | | | | | 1.0 |

Ефективність

Пациенти, включені у групу дослідження А (тільки гемцитабін/карбоплатин), здається, демонструють прогресування хвороби значно раніше ніж пацієнти, випадковим чином відібрані до групи дослідження В (гемцитабін/ карбоплатин + ВА). Приблизно 50 % осіб у групі мають прогресування хвороби до завершення циклу 2 порівняно з менш ніж 15 % осіб у групі В, що мають прогресування на цей самий момент часу.

Було проведено формальний статистичний аналіз з використанням наявних попередніх даних. Цей аналіз засвідчив, що пацієнти, які приймали ВА у поєднанні з гемцитабіном/карбоплатином, мають значно довшу медіану виживання без прогресування (PFS) порівняно з пацієнтами, які отримували тільки гемцитабін/карбоплатин (211 днів проти 67 днів; $P < .0001$; Фігура 5).

Попередня оцінка показника клінічної ефективності (CBR) виконувалася для пацієнтів, які беруть участь у дослідженні, для періоду 120 та 180 днів (CBR-120 та CBR-180, відповідно), та представлена у Таблиці 8.

Таблиця 8

Попередня оцінка клінічного ефекту

| Кінцевий критерій оцінки ефективності | Група А: Гемцитабін/карбоплатин | Група В: Гемцитабін/карбоплатин + BSI-201 | P |
|---------------------------------------|------------------------------------|--|--------|
| Медіана PFS | 67 днів | 211 днів | <.0001 |
| CBR-180 ^a | 5/20 (25 %) | 10/20 (50 %) | 0.1908 |
| CBR-120 ^b | 6/20 (30 %) | 14/20 (70 %) | 0.0256 |

^aSD (108 днів) +PR+CR для перших 40 пацієнтів, залучених у дослідження; ^bSD (120 днів) +PR+CR для перших 40 пацієнтів, залучених у дослідження
Визначення PR включає підтверджені та непідтверджені відгуки.

Результати засвідчують тенденцію до покращення CBR у групи пацієнтів, які приймали гемцитабін/карбоплатин + ВА.

Попередні висновки дослідження

Виходячи з представлених вище результатів, можливо зробити наступні висновки щодо Фази 2 дослідження метастатичного раку TNBC:

- Було залучено пацієнтів, які відповідали потрібним критеріям. Результати аналізу геномного профілю для перших 50 пацієнтів, залучених у дослідження, свідчать, що ці пацієнти дійсно є ER- та PR-негативними та не мають гіперекспресії HER2, що було підтверджено шляхом використання традиційного імуногістохімічного (IHC) аналізу та аналізу профілю генної експресії.

- Вибірка пацієнтів у двох групах дослідження є порівнянною.

о Демографічна інформація свідчить про подібну медіану віку та загальний стан пацієнтів у кожній групі.

о Обсяги попереднього хіміотерапевтичного лікування метастатичної форми є подібними в обох групах. Дані, отримані від перших 69 пацієнтів, свідчать про відсутність суттєвих розбіжностей у попередньому лікуванні щодо кожної групи дослідження. Більше пацієнтів у групі, яка приймала ВА, отримали 2 курси попередньої хіміотерапії, що наводить на думку про те, що ці особи є потенційно більш стійкими до хіміотерапії ніж особи, які приймають тільки гемцитабін/карбоплатин.

о Скорочення доз, як у відсотковій кількості пацієнтів зі скороченнями, так і загальної кількості скорочень, є подібними в обох групах. У групі, що отримувала тільки хіміотерапію, 15 з 39 осіб (38.9 %) мали скорочення дози, а у групі дослідження, що отримувала ВА + хіміотерапію, 11 з 39 осіб (28.2 %) мали скорочення дози. У цілому спостерігалось 20 випадків скорочення дози у групі, що приймає гемцитабін/карбоплатин, та 19 у групі, що приймає ВА + гемцитабін/карбоплатин.

о Показник побічних ефектів (АЕ) є подібним в обох групах, що підтримує висновок про те, що додавання ВА до гемцитабіну/карбоплатину не призводить посилення відомих видів токсичності чи не спричиняє будь-яких нових видів токсичності.

- Пацієнти, які отримували ВА у поєднанні з гемцитабіном/карбоплатином, засвідчують значну клінічну користь порівняно з тими, хто отримував тільки гемцитабін/карбоплатин, виходячи з проміжного аналізу медіани виживання без прогресування (211 днів проти 67 днів; $P < .0001$). Ці результати свідчать про значене покращення показника PFS порівняно з іншими дослідженнями метастатичного раку TNBC.

- Аналіз показника клінічної ефективності на перших 40 пацієнтах, залучених у дослідження, засвідчив тенденцію до покращення при додаванні ВА до гемцитабіну/карбоплатину. Очікується, що цей ефект набути більшої переконливості з розвитком дослідження.

Приклад 8: Лікування раку молочної залози у поєднанні з Паклітакселом, Карбоплатином та ВА

Пацієнти мають тричі негативний метастатичний рак молочної залози з документально підтвердженим прогресуванням хвороби. Вимагається гістологічне підтвердження оригінальної первинної пухлини.

Усі пацієнти мають хворобу з проявами, що піддаються вимірюванню. Хвороба з проявами, що піддаються вимірюванню, передбачає наявність принаймні одного новоутворення, що піддається точному вимірюванню принаймні в одному вимірі (найдовший вимір, що реєструється). Кожне новоутворення повинне бути ≥ 20 мм при вимірюванні з використанням традиційних способів, включаючи пальпацію, оглядові рентгенівські знімки, СТ, та MRI, чи ≥ 10 мм при вимірюванні шляхом спірального сканування СТ.

Пацієнти матимуть принаймні одне "цільове новоутворення", що буде предметом оцінки відгуку на цей протокол лікування, як визначено відповідно до критеріїв оцінки відгуку солідних пухлин (RECIST Розділ 8.1). Пухлини з попередньо опроміненою ділянкою будуть позначатися як "нецільові" новоутворення, за виключенням випадків документування прогресування чи отриманої біопсії на підтвердження наявності пухлини принаймні через 90 днів після завершення променевої терапії. Крім того, пацієнти повинні одужати від впливу недавньої хірургії, рентгенотерапії чи іншої терапії, та не повинні мати поточної інфекції, що вимагала б прийом антибіотиків.

Будь-яка гормональна терапія, спрямована на злоякісну пухлину, має бути припинена принаймні за один тиждень до реєстрації. Продовження гормонально-замісної терапії дозволяється.

Пацієнти мають відповідати наступним вимогам:

- Функція кісткового мозку: кількість тромбоцитів перевищує чи дорівнює 100,000/мікролітр, та абсолютна кількість нейтрофілів (ANC) перевищує чи дорівнює 1,500/мікролітр, еквівалент ступеню 1 відповідно до CTCAE v3.0.

- Ниркова функція: креатинін менше чи дорівнює 1.5 x встановленої верхньої межі норми (ULN), ступінь 1 відповідно до CTCAE v3.0.

- Печінкова функція: Білірубін менше чи дорівнює 1.5 x ULN (ступінь 1 відповідно до CTCAE

v3.0). Щавелево-оцтова трансаміназа глютамінової кислоти у сироватці (SGOT) та лужна фосфатаза менше чи дорівнюють 2.5 x ULN (ступінь 1 відповідно CTCAE v3.0).

- Неврологічна функція: Невропатія (сенсорна та моторна) менше чи дорівнює ступінь 1 CTCAE v3.0.

5 - Пацієнти, здатні до дітонародження, повинні мати негативний сироватковий тест на вагітність до початку участі у дослідженні та користуватися ефективними засобами контрацепції.

Пацієнти, що не відповідають критеріям включення:

10 Пацієнти, які отримували попередню цитотоксичну хіміотерапію для лікування раку молочної залози.

Пацієнти, які мають історію інших інвазивних злоякісних новоутворень, за виключенням немеланомного раку шкіри та інших специфічних злоякісних утворень, зазначених у Розділах 3.23 та 3.24, виключаються, якщо є будь-які докази наявності іншого злоякісного новоутворення за останні п'ять років. Пацієнти також виключаються, якщо їх попереднє лікування раку є протипоказаним щодо терапії, передбаченої цим протоколом.

15 Пацієнти, які отримали попередню рентгенотерапію будь-якої ділянки черевної порожнини чи тазу, ІНШОЇ НІЖ для лікування раку молочної залози протягом останніх п'яти років виключаються. Попереднє опромінення місцево-поширеного раку молочної залози, голови та шиї, чи шкіри дозволяється, за умови, що воно було проведене більше ніж за три роки до реєстрації для участі, та пацієнт не має рецидивів чи метастатичної хвороби.

20 Пацієнти МОГЛИ отримувати попередню ад'ювантну хіміотерапію місцево-поширеного раку молочної залози, за умови що вона була проведена більше ніж за три роки до реєстрації для участі, та пацієнт не має рецидивів чи метастатичної хвороби.

25 Симптоматичні чи запущені метастази головного мозку, які потребують паралельного лікування, включаючи, але не обмежуючись, хірургію, опромінення, та кортикостероїди.

Інфаркт міокарда (MI) протягом 6 місяців від 1 дня дослідження, нестабільна стенокардія, застійна серцева недостатність (CHF) відповідно до класу > II за класифікацією Нью-Йоркської кардіологічної асоціації (NYHA), чи неконтрольована гіпертонія.

Історія епілепсії чи поточне лікування епілепсії.

30 МЕХАНІЗМИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Карбоплатин (Параплатин®, NSC # 241240)

35 Приготування лікувальної форми: Карбоплатин постачається як стерильний ліофілізований порошок, розфасований у флакони з одноразовою дозою, що містить 50 мг, 150 мг та 450 мг карбоплатину для введення шляхом внутрішньовенного вливання. Кожний флакон містить рівні частки за вагою карбоплатину та маннітолу.

Приготування розчину: Безпосередньо перед використанням, вміст кожного флакону має бути відновлений або за допомогою стерильної води для ін'єкції, USP, 5 % декстрази у воді, або ін'єкції 0.9 % хлориду натрію, USP, відповідно до наступної таблиці:

| Концентрація флакону | Об'єм розчинника |
|----------------------|------------------|
| 50 мг | 5 мл |
| 150 мг | 15 мл |
| 450 мг | 45 мл |

40 Усі ці розчинення утворюють концентрацію карбоплатину 10 мг/мл.

Примітка: Алюміній вступає у реакцію з карбоплатином, спричиняючи випадання в осад та втрату активності. Таким чином, голки чи комплекти для внутрішньовенного вливання, які містять частини з алюмінію, що можуть контактувати з препаратом, не повинні застосовуватися

45 для приготування чи введення карбоплатину.
Зберігання: Невідкриті флакони з карбоплатином залишаються стабільними протягом терміну, зазначеного на упаковці, за умови зберігання при контрольованій кімнатній температурі та захисту від світла.

50 Стабільність: Коли готуються відповідно до вказівок, розчини карбоплатину зберігають стабільність протягом восьми годин при кімнатній температурі. Оскільки лікувальна форма препарату не містить антибактеріального консерванту, рекомендується забракувати розчини карбоплатину через вісім годин після розчинення.

Постачальник: Випускаються для продажу компанією "Bristol-Myers Squibb Company".

Паклітаксел (Таксол®, NSC # 673089)

55 Приготування лікувальної форми: Паклітаксел є слабозрозумним рослинним продуктом, що виготовляється з ягідного тису (*Taxus baccata*). Покращення розчинності потребує змішаної

системи розчинників з подальшим розчиненням або 0.9 % у хлориду натрію чи у 5 % декстрази у воді.

Паклітаксел постачається як стерильний концентрат розчину, 6 мг/мл у 5 мл флаконах (30 мг/флакон) у поліоксіетильованій касторовій олії ("Cremophor EL") 50 % та абсолютному спирті, USP, 50 %. Вміст флакону має розбавлятися безпосередньо перед клінічним використанням. Він також розфасовується у флакони по 100 та 300 мг.

Приготування розчину: Паклітаксел, у відповідній дозі, буде розбавлятися у 500-1000 мл 0.9 % ін'єкції хлориду натрію, USP чи 5 % ін'єкції декстрази, USP (D5W) (500 мл є адекватними, якщо паклітаксел є єдиним агентом). Паклітаксел повинен готуватися у склянці чи поліолефінових контейнерах шляхом вилуговування діетилгексилфталатового (DEHP) пластифікатору з полівінілхлоридових (PVC) пакетів та за допомогою системи для внутрішньовенних інфузій з носієм "Cremophor", у якому розчиняється паклітаксел.

Примітка: Формування невеликої кількості волокон у розчині (в допустимих межах, визначених відповідно до USP тесту на тверді частки для парентеральних препаратів у великих об'ємах (LVP)) спостерігалось після приготування паклітакселу. Таким чином, необхідна прохідна фільтрація для введення розчинів паклітакселу. Прохідна фільтрація повинна виконуватися за допомогою гідрофільного, мікропористого фільтру з розміром пор не більше ніж 0.22 мікрон (наприклад: IVEX-II, IVEX-HP чи еквівалент), встановленого у IV проході рідини від інфузійного насоса. Попри те, що формування часток не свідчить про втрату препаратом своєї активності, розчини, які мають надмірну кількість сформованих часток не повинні використовуватися.

Зберігання: цілі флакони можуть зберігатися при температурі в межах 20-25 °C (36-77 °F) у оригінальній упаковці. Заморожування чи охолодження не має негативного впливу на стабільність продукту.

Стабільність: Усі розчини паклітакселу відзначаються легким помутнінням, що є прямо пропорційним концентрації препарату та часу, що сплинув з моменту приготування, хоча, якщо приготовані, як описано вище, розчини паклітакселу (0.3-1.2 мг/мл) зберігають фізичну та хімічну стабільність протягом 27 годин при температурі оточуючого середовища (приблизно 25 °C) та в умовах освітлення приміщення.

Постачальник: Випускаються для продажу компанією "Bristol-Myers Squibb Company".

Введення: Паклітаксел, у відповідній дозі та розчиненні, буде вводиться шляхом вливання (інфузії) комплектом IV протягом 3 годин безперервно. Паклітаксел буде вводиться через пристрій контролю вливання (насос) з використанням системи трубок без ПВХ та конекторів, таких як комплекти для внутрішньовенних інфузій IV (поліетилен чи поліолефін), що застосовуються для парентеральної інфузії нітрогліцерину. Жоден інший препарат не повинен вводиться по лінії, по якій вводиться паклітаксел. Дивіться розділ 5.2.

ВА (4-Йодо-3-Нітробензамід)

ВА буде виготовлятися та упаковуватися від імені "BiPar Sciences" та поширюватися відповідно до дистриб'юторських процедур на основі затверджених BiPar клінічних досліджень препарату. ВА буде представлений у вигляді рідинного стерильного продукту у 10 мл разових флаконах. ВА готується у 25 % гідроксилпропілбетациклодекстрині / 10 mM фосфатному буфері, pH 7.4 з концентрацією активного інгредієнту 10 мг/мл. Кожен флакон містить не менше 9.0 мл об'єму, що екстрагується. Інформація, зазначена на етикетках препарату для дослідження буде відповідати вимогам Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог щодо реєстрації медикаментів, що призначені для лікування людей (ICH) та вимогам Адміністрації з контролю за продуктами харчування та ліків США (FDA). Партії флаконів ВА будуть постачатися у картонних коробках по 10 флаконів на коробку та будуть маркуватися односторонньою етикеткою. Етикетка буде містити наступну інформацію: заяву-застереження відповідно до вимог США щодо медичного препарату, що проходить клінічне випробування, номер дослідження, назву продукту, концентрацію, умови зберігання, дату повторного тестування та назву організатора дослідження.

Приготування розчину: ВА буде готуватися, як описано нижче, та буде вводиться внутрішньовенно протягом однієї години:

Розрахунок кількості (4 мг/кг) ВА, необхідної для дозування, на основі базової ваги пацієнта помноженої на рівень дози. Наприклад:

Базова вага пацієнта = 70 кг

Доза = 4 мг/кг

Потрібна доза = (4 мг/кг × 70 кг) = 280 мг ВА

Поділити потрібну дозу ВА на концентрацію ВА у флаконі (10 мг/мл) з метою визначення кількості у мл препарату ВА, потрібної для введення пацієнтові. Приклад:

280 мг ÷ 10 мг/мл = 28 мл

Підрахувати кількість флаконів ВА по 10 мл у флаконі, щоб отримати необхідний об'єм (використовуючи цей приклад, буде необхідно 3 флакони). Додатковий флакон може бути використано, якщо знадобиться отримати необхідний об'єм ВА.

5 Набрати шприцом необхідний об'єм препарату ВА з флакону та покласти його поруч, приготувавши тим часом комплект для внутрішньовенної інфузії IV наступним чином:

Рекомендується, щоб увесь об'єм 250 мл розчину знаходився у пакеті комплекту системи IV та вводився протягом періоду однієї години. Використовувати IV розчин або з 0.9 % хлориду натрію (NS) чи D5W. Якщо вливання починають з пакетом IV, що містить більше 250 мл розчину, необхідно видалити та забракувати надлишковий розчин плюс загальний об'єм препарату, що має додаватися до розчину. Впорскувати розрахований об'єм препарату ВА у пакет IV та забезпечити відповідне змішування. Закріпити трубки комплекту IV та заповнити їх розчином.

15 Примітка: Дозволяється використовувати порожній пакет комплекту IV та впорскувати об'єм ВА, відповідно до розрахунку, а потім додати 0.9 % NS чи D5W до досягнення загального об'єму 250 мл. Цей підхід є більш зручним при використанні об'ємів ВА, що є більшими ніж 50 мл.

20 Зберігання: флакони з препаратом ВА повинні зберігатися при 2-8 °C та мають бути захищеними від світла. Зберігати флакони з препаратом в оригінальних картонних коробках та помістити їх до терморегульованого апарату при 2-8 °C. ВА може зберігатися при 25 °C протягом 24 годин, якщо потрібно. Якщо було встановлено, що препарат ВА зберігався без дотримання цих умов, будь ласка, негайно зв'яжіться з "BiPar". Не використовувати флакони, які зберігалися без дотримання рекомендованих умов зберігання без дозволу "BiPar".

25 Стабільність: Ввести препарат ВА протягом 8 годин після підготовки. Дозований розчин має зберігатися при температурі зовнішнього середовища (кімнатній температурі) до його введення суб'єкту дослідження.

Постачальник: "BiPar Sciences Inc".

ПЛАН ЛІКУВАННЯ

30 175 мг/м² Паклітакселу шляхом тригодинного вливання, що супроводжується Карбоплатином у дозуванні AUC = 6.0 протягом 30 хвилин, на День 1, кожні 21 дні плюс ВА 4 мг/кг IV протягом одногодинного вливання двічі на тиждень, починаючи у День 1 (دوزи ВА повинні відокремлюватися принаймні 2 днями) до того моменту, коли прогресування хвороби чи побічні ефекти обмежать подальшу терапію. Цей тритижневий період часу розглядається як один цикл лікування. Кількість циклів після повного клінічного відгуку буде визначатися на розсуд лікуючого терапевта. Пацієнти, які не відповідають критеріям прогресування хвороби (частковий відгук чи стабілізація хвороби), мають продовжувати участь у дослідному лікуванні до досягнення межі, обумовленої токсичністю.

40 Дозування Карбоплатину: Доза буде розраховуватися для досягнення цільової зони відповідно до кривої (AUC) концентрації x час за формулою Калверта з використанням розрахункової швидкості клубочкової фільтрації (GFR) відповідно до формули Джелліффе. Початкова доза буде становити AUC = 6, що вливається протягом 30 хвилин.

45 Початкова доза карбоплатину повинна розраховуватися з використанням GFR. За відсутності нової ниркової непрохідності чи іншої ниркової токсичності, що перевищує чи дорівнює ступеню 2 відповідно до CTCAE v3.0 (креатинін сироватки крові > 1.5 x ULN), доза карбоплатину не буде повторно розраховуватися для наступних циклів, але буде предметом зміни дози, як зазначається.

50 У пацієнтів з патологічно низьким креатиніном у сироватці (менше чи дорівнює 0.6 мг/дл), внаслідок пониженого введення білку та/чи низької м'язової маси, кліренс креатиніну повинен оцінюватися на основі мінімального значення 0.6 мг/дл. За наявності більш відповідного базового значення креатиніну протягом 4 тижнів лікування, воно також може використовуватися для початкової оцінки GFR.

Формула Калверта: Доза Карбоплатину (мг) = цільова AUC × (GFR + 25).

55 Для цілей цього протоколу, GFR вважається еквівалентним кліренсу креатиніну. Кліренс креатиніну (C_{cr}) оцінюється методом Джелліффе з використанням наступної формули: {98 - [0.8 (вік - 20)]} C_{cr} = 0.9 × Scr. Де: C_{cr} = оціночний кліренс креатиніну у мл/хвилину; Вік = вік пацієнта у роках (від 20 до 80); Scr = креатинін у сироватці у мг/дл. За відсутності нової ниркової непрохідності чи підвищення креатиніну у сироватці понад 1.5 x ULN (ступінь 2 CTCAE v3.0), доза карбоплатину не буде повторно розраховуватися для наступних циклів, але буде предметом зміни дози відповідно до гематологічних критеріїв та інших проявів, як зазначається.

60 Рекомендований спосіб призначення хіміотерапії: режим може призначатися пацієнтам амбулаторно. Паклітаксел буде вводиться шляхом тригодинного вливання, що

супроводжується карбоплатином протягом 30 хвилин, та супроводжується ВА протягом однієї години. ВА буде вводиться внутрішньовенно (шляхом вливання (інфузії) протягом періоду однієї години) двічі на тиждень протягом тривалості дослідження. Дози ВА повинні бути відокремлені одна від одної принаймні 2 днями (наприклад дози можуть вводиться у Понеділок/Четвер, Понеділок/П'ятницю чи Вівторок/П'ятницю). Режим прийому протиплєвотних засобів рекомендується у 1 день лікування паклітакселом та карбоплатином. Режим прийому протиплєвотних засобів, який обирається, має ґрунтуватися на рекомендаціях, досягнутих шляхом консенсусу експертних оцінок. Профілактичні протиплєвотні засоби не потрібні при введенні доз тільки окремо ВА.

Режим підготовки до прийому Паклітакселу: Паклітаксел, в рамках даного дослідження, буде вводиться протягом тригодинного вливання. Для усіх циклів, що передбачають введення паклітакселу, рекомендується проведення режиму підготовки з метою зниження ризику, пов'язаного з алергічними реакціями. Цей режим має включати дексаметазон (або комплектом IV, або перорально (PR)), анти-гістамін H1 (такий як дифенгідрамін) та анти-гістамін H2 (такі як циметидин, ранітидин чи фамотидин).

Максимальна площа поверхні тіла, що використовується для розрахунків дози, становить 2.0 м^2 .

Якщо побічні ефекти є несерйозними, пацієнт може приймати агент, що досліджується, протягом невизначеного часу на розсуд дослідника. Пацієнти, які досягли повного клінічного відгуку, можуть продовжувати отримувати додаткові цикли на розсуд лікуючого терапевта.

КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ

Параметри відгуку - критерії RECIST

Хвороба з проявами, що піддаються вимірюванню, передбачає наявність принаймні одного новоутворення, що піддається точному вимірюванню принаймні в одному вимірі (найдовший вимір, що реєструється). Кожне новоутворення повинне бути ≥ 20 мм при вимірюванні з використанням традиційних способів, включаючи пальпацію, оглядові рентгенівські знімки, СТ та MRI, чи ≥ 10 мм при вимірюванні шляхом спірального сканування СТ.

Документування "цільових" та "нецільових" новоутворень до початку дослідження.

Усі новоутворення, що піддаються вимірюванню, максимум до 5 новоутворень на орган та 10 новоутворень загалом, що представляють усі уражені органи, мають бути ідентифіковані як цільові новоутворення, підлягають документуванню та вимірюванню до початку дослідження. Цільові новоутворення мають обиратися на основі їх розміру (новоутворення з найдовшим виміром) та їх придатності до здійснення точних повторюваних вимірювань (або шляхом томографічних методів чи клінічно). Сума найдовшого виміру (LD) для всіх цільових новоутворень буде розраховуватися та документуватися як вихідна сума LD. Вихідна сума LD буде застосовуватися як довідниковий показник, за допомогою якого надалі буде охарактеризовано об'єктивний відгук пухлини на основі виміру хвороби, що піддається вимірюванню.

Усі інші новоутворення (чи ділянки хвороби) мають бути ідентифіковані як нецільові новоутворення та також мають документуватися до початку дослідження. Вимірювання цих новоутворень не вимагається, потрібен лише нагляд за "наявністю" чи "відсутністю" цих новоутворень.

Усі початкові (вихідні) оцінки стану хвороби мають здійснюватися якомога ближче до початку лікування та ніколи більш ніж за 4 тижні до початку лікування.

Найкращий відгук

Вимірювання найдовшого виміру кожного новоутворення потрібне з метою нагляду. Зміна суми цих вимірів дозволяє здійснювати певну оцінку зміни розміру пухлини, а отже терапевтичної ефективності. Уся хвороба має оцінюватися на основі таких самих методів, що застосовувалися перед початком дослідження. Реєстрація подібних змін в кожному індивідуальному випадку має розглядатися відносно найкращого відгуку, досягнутого цим випадком з часу початку участі у дослідженні.

Повний Відгук (CR): Зникнення усіх цільових та нецільових новоутворень, та відсутність задокументованих доказів появи нових утворень протягом двох оцінок хвороби з різницею між ними принаймні 4 тижні.

Частковий Відгук (PR) являє собою принаймні 30 % зменшення суми найдовших вимірів (LD) для усіх цільових новоутворень, що піддаються вимірюванню, порівняно з довідниковим показником вихідної (до початку дослідження) суми LD. Може спостерігатися відсутність чіткого прогресування нецільових новоутворень та нових утворень. Потрібне документування на основі двох оцінок хвороби з різницею між ними принаймні 4 тижні. У випадку, коли ЄДИНИМ цільовим новоутворенням є одиночне пухлинне утворення в малому тазі, виміряне шляхом фізикального

обстеження, яке не піддається рентгенологічному вимірюванню, потрібне 50 % зменшення LD.

Прогресуюча хвороба передбачає принаймні 20 % збільшення суми LD цільових новоутворень порівняно з довідниковими показниками, за які береться найменша сума LD, чи виникнення нових утворень протягом 8 тижнів від початку дослідження. Нечітке прогресування існуючих нецільових новоутворень, інших ніж плевральний випіт без цитологічного підтвердження неопластичного походження, на думку лікуючого терапевта протягом 8 тижнів від початку дослідження також розглядається як прогресуюча хвороба (за таких обставин необхідне обґрунтування). У випадку, коли ЄДИНИМ цільовим новоутворенням є одиночне пухлинне утворення в малому тазі, виміряне шляхом фізикального обстеження, яке не піддається рентгенологічному вимірюванню, потрібне 50 % зменшення LD.

Симптоматичне погіршення визначається як загальне погіршення стану здоров'я, що приписується хворобі, яке потребує зміни терапії без об'єктивних доказів прогресування.

Стабілізація хвороби - будь-який стан, що не відповідає вищезазначеним критеріям.

Непридатний для оцінки відгуку визначається як такий, що не піддавався повторним оцінкам пухлини від початку застосування дослідної терапії з причин, не пов'язаних із симптомами чи проявами хвороби.

Прогресування (дослідження хвороби, що має прояви, які піддаються вимірюванню) визначається як БУДЬ-ЯКИЙ з наступних випадків:

Принаймні 20 % збільшення суми LD цільових новоутворень порівняно з довідниковим показником, за який береться найменша сума LD, зареєстрована від початку дослідження.

У випадку, коли ЄДИНИМ цільовим новоутворенням є одиночне пухлинне утворення в малому тазі, виміряне шляхом фізикального обстеження, яке не піддається рентгенологічному вимірюванню, потрібне 50 % зменшення LD порівняно з довідниковим показником, за який береться найменший LD, зареєстрований від початку дослідження.

Виникнення одного чи більше нових утворень.

Смерть від хвороби без попереднього об'єктивного документування прогресування.

Загальне погіршення стану здоров'я, що приписується хворобі, яке потребує зміни терапії без об'єктивних доказів прогресування.

Нечітке прогресування існуючих нецільових новоутворень, інших ніж плевральний випіт без цитологічного підтвердження неопластичного походження, на думку лікуючого терапевта (за таких обставин необхідне обґрунтування).

Рецидив (дослідження хвороби, що має прояви, які не піддаються вимірюванню) визначається як підвищення клінічних, радіологічних чи гістологічних проявів хвороби від початку дослідження.

Виживання є фактичною тривалістю життя від початку дослідження до смерті чи дати останнього контакту.

Виживання без прогресування (дослідження хвороби, що має прояви, які піддаються вимірюванню) є періодом від початку дослідження до прогресування хвороби, смерті чи дати останнього контакту.

Безрецидивне виживання (дослідження хвороби, що має прояви, які не піддаються вимірюванню) є періодом від початку дослідження до рецидиву хвороби, смерті чи дати останнього контакту.

Суб'єктивні параметри, включаючи загальний стан, специфічні симптоми та побічні ефекти, класифікуються відповідно до STCAE v3.0.

ТРИВАЛІСТЬ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пацієнти будуть отримувати терапію до моменту прогресування хвороби чи виникнення непереносної токсичності. Пацієнт може відмовитися від дослідного лікування у будь який момент. Пацієнти з повним клінічним відгуком на терапію будуть продовжувати отримувати терапію із додатковою кількістю циклів на розсуд лікуючого терапевта. Пацієнти з частковим відгуком чи стабілізацією хвороби повинні продовжувати отримувати терапію до тих пір, поки подальша терапія стане неможливою через виникнення непереносної токсичності.

Усі пацієнти будуть лікуватися (із оформленням усіх необхідних індивідуальних реєстраційних карт) до моменту прогресування хвороби чи припинення участі у дослідженні. Після цього буде здійснюватися нагляд за пацієнтами (з фізичним обстеженням та веденням історії) кожні три місяці протягом перших двох років, а потім кожних шість місяців протягом наступних трьох років. Буде здійснюватися контроль пацієнтів на предмет запізнілої токсичності та виживання протягом цього 5-річного періоду із поданням форм типу "Q" до Гінекологічно-онкологічної групи (GOG) Статистичного центру обробки даних, до тих пір, поки пацієнт не відкликає свою згоду.

Приклад 9: Поєднання 4-йодо-3-нітробензаміду (BA) з гамма опроміненням

Клітини тричі негативного раку молочної залози MDA-MB-468 було отримано від ATCC та культивовано у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM), що містило 10 % ембріональної сироватки телят. Клітини висівалися при нормі 10^5 клітин на чашку для культивування клітин Р100 чи при 10^4 клітин на чашку для культивування клітин Р60 у присутності сполук у різних концентраціях чи контролю DMSO. Після обробки, кількість приєднаних клітини вимірювалася за допомогою лічильника Культера, та шляхом фарбування 1 % метиленовим синім. Метиленовий синій розчинявся у 50 %-50 % суміші Метанолу та води. Клітини висівалися на планшет на 24 чи 96 лунок та оброблялися, як планувалося, середовище аспірували, клітини промивали PBS, фіксованим у метанолі на 5-10 хвилин, метанол аспірували, а планшетах давали можливість повністю висохнути. Розчин метиленового синього додавався до лунок та планшети інкубували протягом 5 хвилин. Фарбувальний розчин видалявся, а планшети промивалися dH₂O до втрати синього кольору. Після повного висушування планшетів, незначна кількість 1N HCl додавалася до кожної лунки для екстрагування метиленового синього. Зчитування показників OD при 600 нм та калібрувальна крива використовувалися для визначення кількості клітин.

ВА сполуки безпосередньо з сухого порошку в 10 мМ маточного розчину в DMSO для кожного окремого експерименту. Контрольні експерименти виконувалися з відповідним об'ємом / концентрацією носія (DMSO); у цих контрольних дослідках, клітини не демонстрували змін у своєму рості чи розподілі клітинного циклу.

Аналіз шляхом виключання з PI, аналіз клітинного циклу, метод TUNEL та аналіз маркуванням BrdU виконуються, як описано вище у Прикладі 2.

Раку клітини MDA-MB-468 піддаються дії 3 греїв гамма опромінення разом чи без 100 μ M ВА. Як зображено на ФІГУРІ 6, ВА потенціює зупинку клітинного циклу S- та G2/M та посилює протипроліферативний ефект гамма опромінення на людський тричі негативний рак молочної залози клітин MDA-MB-468.

Попри те, що варіанти даного винаходу, яким надається перевага, було зображено та описано у цій специфікації, для спеціалістів даної галузі буде очевидним, що ці варіанти наводяться тільки у якості прикладів. Чисельні варіанти, зміни та заміщення можуть бути реалізовані спеціалістами даної галузі, при цьому не відступаючи від винаходу. Слід розуміти, що чисельні альтернативи до варіантів винаходу, описаних у цій специфікації, можуть застосовуватися при практичному застосуванні винаходу. Передбачається, що наступна формула винаходу визначає обсяг винаходу, а способи та структури в межах цієї формули винаходу та їх еквіваленти мають бути охоплені цією формулою винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування раку молочної залози, який є негативний щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR") і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2") у пацієнта, що включає призначення пацієнтові, який має рак молочної залози, який є негативним щодо ER, PR і HER2 ефективною кількістю 4-йодо-3-нітробензаміду або його метаболіту або фармацевтично прийнятної солі, гемцитабіну і карбоплатину.

2. Спосіб за п. 1, де 4-йодо-3-нітробензамід або його метаболіт, або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин забезпечені в окремих лікарських формах і вводяться послідовно.

3. Спосіб за п. 1, де 4-йодо-3-нітробензамід або його метаболіт, або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин забезпечені в окремих лікарських формах і вводяться одночасно.

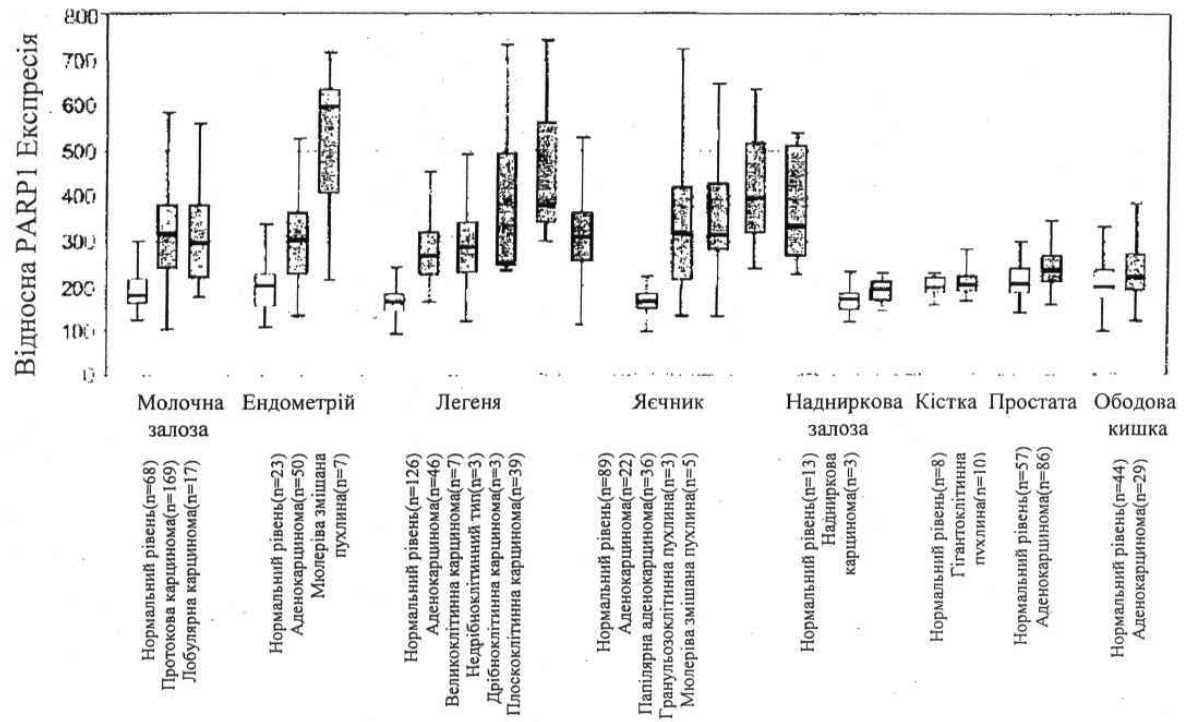
4. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де ефективна кількість викликає щонайменше один терапевтичний ефект, вибраний з групи, яка складається із зменшення в розмірі пухлини молочної залози, зменшення метастазування, повної ремісії, часткової ремісії, стабілізації хвороби або повної патологічної регресії.

5. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де досягається рівень клінічної ефективності (CBR = CR (повна ремісія) + PR (часткова ремісія) + SD (стабілізація хвороби) \geq 6 місяців), у порівнянні з лікуванням вказаним гемцитабіном і вказаним карбоплатином, введеними без 4-йодо-3-нітробензаміду.

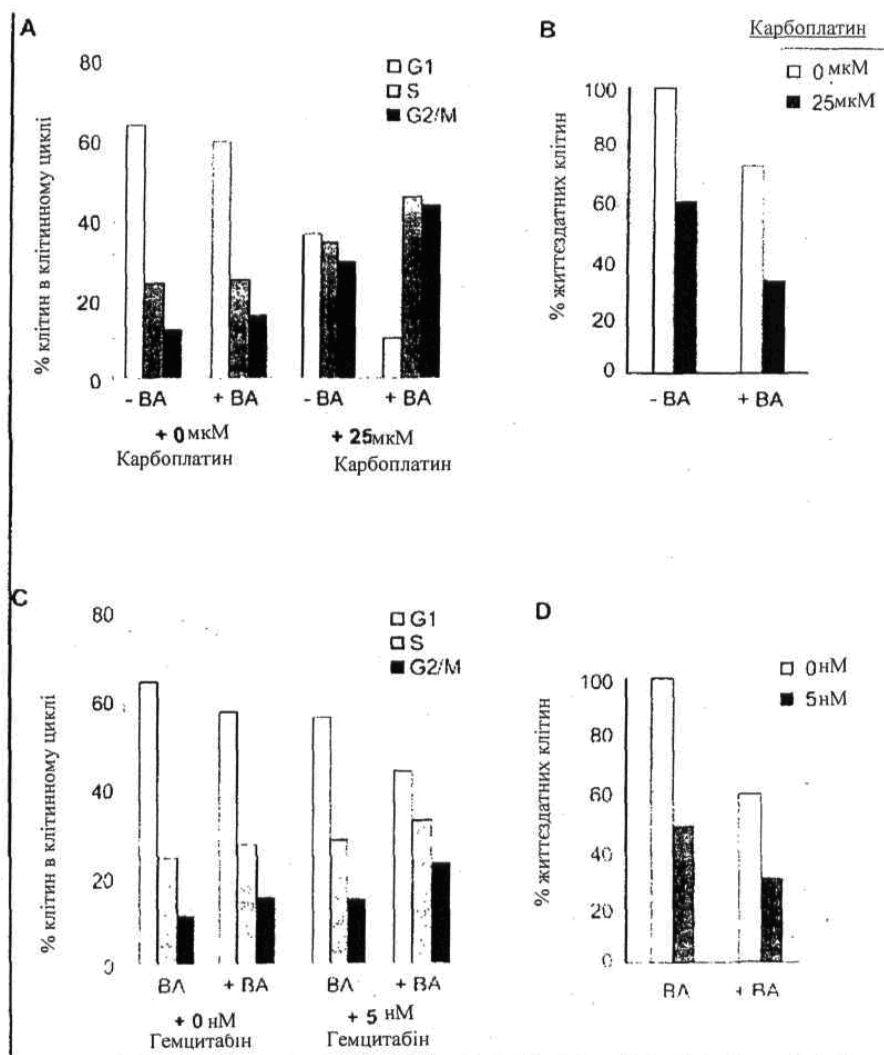
6. Спосіб за п. 5, де покращення рівня клінічної ефективності становить приблизно 60 % або вище.

7. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де рак молочної залози знаходиться на стадії I, стадії II або стадії III.

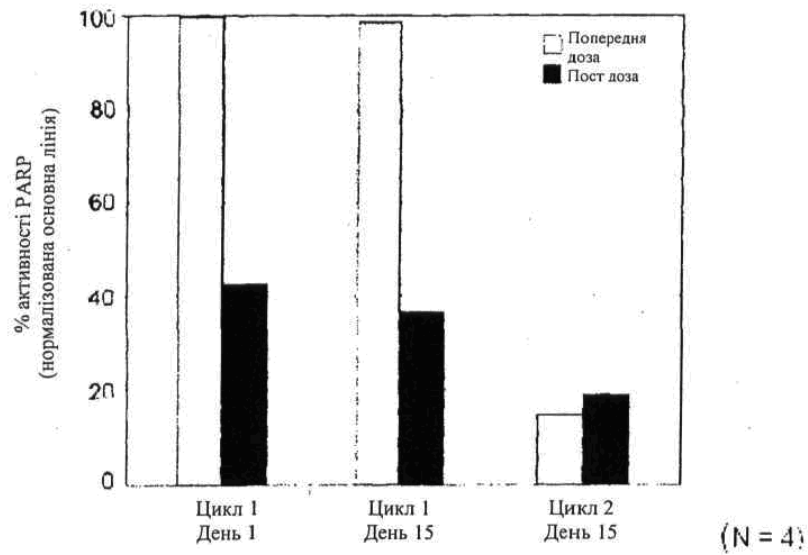
8. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, який додатково включає хірургію, променеву терапію, хіміотерапію, генну терапію, ДНК терапію, вірусну терапію, РНК терапію, ад'ювантну терапію, неoad'ювантну терапію, імунотерапію, нанотерапію або їх поєднання.
9. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, який додатково включає призначення пацієнтові гамма-опромінення.
- 5 10. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де вказаний рак молочної залози є інвазивною внутрішньопротоковою карциномою.
11. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де вказаний рак молочної залози є метастатичним.
12. Спосіб за пп. 1, 2 або 3, де вводиться ефективна кількість 4-йодо-3-нітробензаміду або його фармацевтично прийнятної солі.
- 10 13. Спосіб за п. 12, де пацієнт отримує цикл лікування щонайменше 11 днів, і на 1, 4, 8 і 11 дні циклу пацієнт отримує від приблизно 10 до приблизно 100 мг/кг 4-йодо-3-нітробензаміду або молярно еквівалентну кількість речовини його метаболіту.
14. Застосування 4-йодо-3-нітробензаміду або його метаболіту, або його фармацевтично прийнятної солі, гемцитабіну і карбоплатину для виробництва лікарських препаратів для
- 15 лікування раку молочної залози, який є негативним щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR") і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2").
15. Застосування за п. 14, де 4-йодо-3-нітробензамід або його метаболіт, або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин забезпечені в окремих лікарських
- 20 формах і вводяться послідовно.
16. Застосування за п. 14, де 4-йодо-3-нітробензамід або його метаболіт, або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин забезпечені в окремих лікарських формах і вводяться одночасно.
17. Застосування за пп. 14, 15 або 16, де ефективна кількість викликає щонайменше один
- 25 терапевтичний ефект, вибраний з групи, яка складається із зменшення в розмірі пухлини молочної залози, зменшення метастазування, повної ремісії, часткової ремісії, стабілізації хвороби або повної патологічної регресії.
18. Застосування за п. 14, 15 або 16, де рак молочної залози знаходиться на стадії I, стадії II або стадії III.
- 30 19. Застосування за п. 14, 15 або 16, де вказаний рак молочної залози є інвазивною внутрішньопротоковою карциномою.
20. Застосування за п. 14, 15 або 16, де вказаний рак молочної залози є метастатичним.
21. Застосування за п. 14, 15 або 16, де вводиться ефективна кількість 4-йодо-3-нітробензаміду або його фармацевтично прийнятної солі.
- 35 22. Комбінація 4-йодо-3-нітробензаміду або його фармацевтично прийнятної солі, гемцитабіну і карбоплатину.
23. Комбінація за п. 22, де 4-йодо-3-нітробензамід або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин присутні в одному складі.
24. Комбінація за п. 22, де 4-йодо-3-нітробензамід або його фармацевтично прийнятна сіль, гемцитабін і карбоплатин присутні в різних складах.
- 40 25. Композиція, яка включає 4-йодо-3-нітробензамід або його метаболіт, або його фармацевтично прийнятну сіль, гемцитабін і карбоплатин разом з фармацевтично прийнятним носієм.
26. Набір, що включає комбінацію флаконів, де перший флакон включає 4-йодо-3-нітробензамід або його фармацевтично прийнятну сіль, другий флакон включає гемцитабін і карбоплатин, для
- 45 лікування раку молочної залози, який є негативний щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR"), і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2").
27. Набір, що включає комбінацію флаконів, де перший флакон включає 4-йодо-3-нітробензамід або його фармацевтично прийнятну сіль, другий флакон включає гемцитабін і третій флакон
- 50 включає карбоплатин, для лікування раку молочної залози, який є негативний щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR"), і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2").
28. Використання ефективної кількості 4-йодо-3-нітробензаміду або його метаболіту, або фармацевтично прийнятної солі, гемцитабіну і карбоплатину для лікування раку молочної
- 55 залози, який є негативний щодо естрогенового рецептора ("ER"), прогестеронового рецептора ("PR"), і рецептора людського епідермального фактора росту 2 ("HER2") у пацієнта.



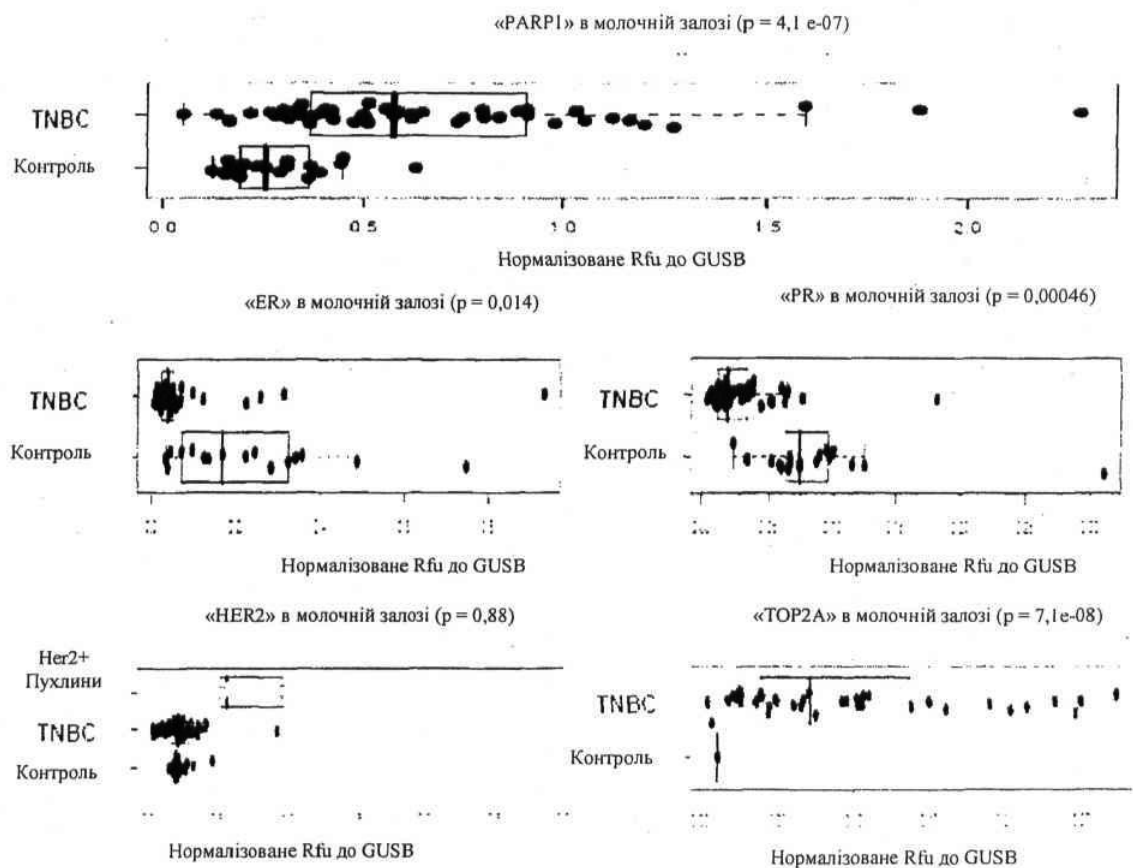
Фіг. 1



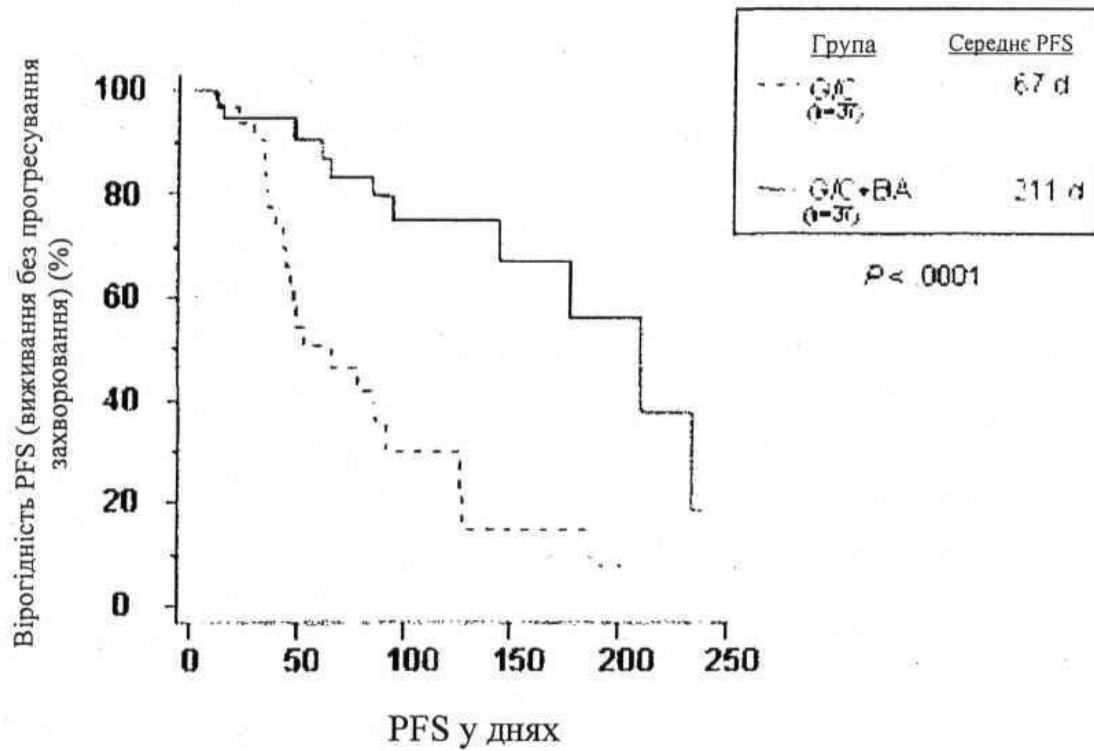
Фіг. 2



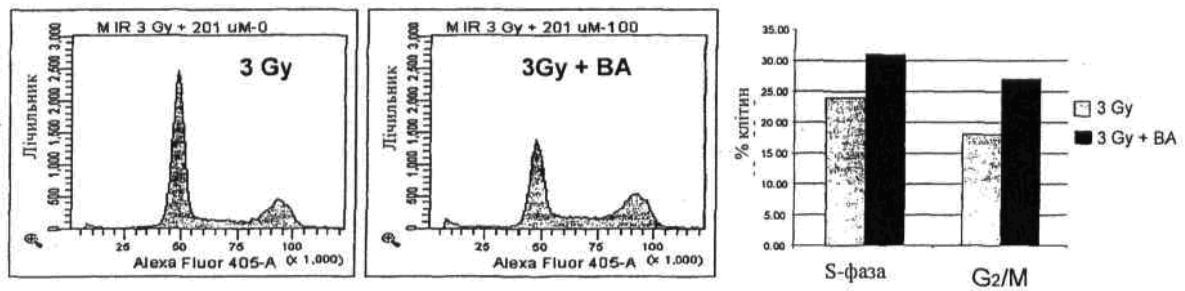
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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