

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 048213

(13) B1

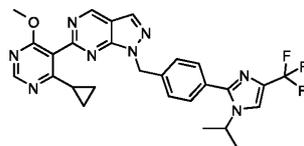
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента 2024.11.07
(21) Номер заявки 202291919
(22) Дата подачи заявки 2021.02.12
- (51) Int. Cl. A61K 31/135 (2006.01)
A61K 31/136 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/423 (2006.01)

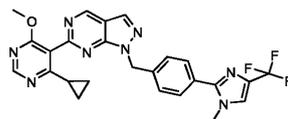
(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНГИБИТОРЫ
УБИКВИТИН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ 1 (USP1) И ИНГИБИТОРЫ
ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ (PARP)

- (31) 62/976,864; 63/032,245; 63/146,937
(32) 2020.02.14; 2020.05.29; 2021.02.08
(33) US
(43) 2022.12.02
(86) PCT/US2021/017912
(87) WO 2021/163530 2021.08.19
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЕЙЭСКЬЮ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)
(72) Изобретатель:
Вайли Эндрю Алистер, Шенкер
Соломон Мартин, Салливан Памела
Джин, Стегмейер Франк, Кадзоу Анна
- Луиза, Лю Ханьянь, Синкевициус
Керстин Вульф (US)
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)
(56) US-A1-20170202810
WO-A1-2018183349
DAS et al., "Blockade of Deubiquitylating
Enzyme USP1 Inhibits DNA Repair and Triggers
Apoptosis in Multiple Myeloma Cells," Clinical
Cancer Research, Vol. 23, Iss. 15, 07 March 2017
(07.03.2017), Pgs. 4280-4289
US-A1-20190076427
WO-A1-2018165615
WO-A1-2020132269

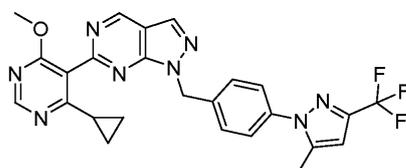
- (57) В изобретении предложены терапевтические комбинации, содержащие: (i) ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитор поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, причем ингибитор USP1 содержит



(I),



(II) или



(III),

B1

048213

048213 B1

или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, аморфные твердые вещества или полиморфы. Изобретение также направлено на применение этих комбинаций для ингибирования белка USP1 и/или PARP и/или для лечения нарушения, чувствительного к ингибированию белков USP1 и/или PARP и активности USP1 и/или PARP. Комбинации по изобретению являются особенно полезными при лечении рака.

048213 B1

048213 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительным заявкам США №№ 63/146937, поданной 8 февраля 2021 г., 63/032245, поданной 29 мая 2020 г., и 62/976864, поданной 14 февраля 2020 г., раскрытие каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде через efs-web

Содержимое перечня последовательностей, представленного в электронном виде (название: 4195_012PC03_Seqlisting_ST25.txt; размер: 7446 байт и дата создания: 11 февраля 2021 г.), полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Область техники

В настоящем изобретении предложены терапевтические комбинации, содержащие ингибиторы убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и ингибиторы поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP). Также предложены способы лечения раковых заболеваний, включающие введение этих комбинаций.

Уровень техники

Убиквитин представляет собой небольшой (76 аминокислот) белок, который посттранскрипционно присоединен к белкам-мишеням. Последствие убиквитинирования определяется количеством и топологией связи молекул убиквитина, конъюгированных с белком-мишенью. Например, белки, демонстрирующие 48-связанные цепи полиубиквитина, обычно нацелены к протеасоме для деградации, тогда как цепи моноубиквитина или полиубиквитина, связанные посредством других лизинов, регулируют непротеолитические функции, такие как регуляция клеточного цикла, репарация повреждений ДНК, транскрипция и эндоцитоз. Убиквитинирование - это обратимый процесс, а ферменты, называемые деубиквитиназы, удаляют убиквитин из белков-мишеней. USP1 представляет собой деубиквитиназу, которая играет роль в репарации повреждений ДНК. USP1 взаимодействует с UAF1 (ассоциированный с USP1 фактор 1) с образованием комплекса, который необходим для активности деубиквитиназы. Комплекс USP1/UAF1 деубиквитинирует моноубиквитинированный PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) и моноубиквитинированный FANCD2 (комплементирующая группа анемии Фанкони D2), которые являются белками, выполняющими важные функции для синтеза "через" поврежденные участки (translesion synthesis - TLS) и пути анемии Фанкони (Fanconi anemia - FA), соответственно.

Комплекс USP1/UAF1 также деубиквитинирует комплементирующую группу анемии Фанкони I (Fanconi anemia complementation group I - FANCI). Эти два пути необходимы для репарации ДНК после повреждения, индуцированного перекрестно-сшивающими ДНК агентами, такими как цисплатин и митомицин C (MMC).

Семейство ферментов поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) играет роль в репарации ДНК и целостности генома. PARP имеет решающее значение для путей репарации одноцепочечных разрывов и эксцизионной репарации оснований. Ключевая ферментная активность заключается в добавлении АДФ-рибозы к субстратному белку посредством расщепления NAD⁺ и высвобождения никотинамида. Такая активность поли(АДФ-рибозил)ирования ("PAR-илирование") активируется в результате разрывов цепочек ДНК, что приводит к добавлению Par к самой PARP и другим ферментам репарации ДНК. PARP имеет решающее значение для рекрутирования белков репарации ДНК в места повреждений.

Гомологичная рекомбинация представляет собой процесс репарации ДНК, имеющий решающее значение для точной репарации повреждения ДНК. Гены BRCA1/2 вместе с другими генами пути анемии Фанкони (например, RAD51D, NBN, ATM) являются компонентами опосредованной гомологичной рекомбинацией репарации ДНК. Мутации в генах, кодирующих факторы гомологичной рекомбинации, играют роль в развитии некоторых раковых заболеваний. Ингибиторы PARP предотвращают репарацию одноцепочечных разрывов ДНК и способствуют превращению одноцепочечных разрывов в двухцепочечные разрывы, что вызывает синтетическую летальность в раковых клетках, у которых отсутствуют эффективные механизмы репарации двухцепочечных разрывов, такие как гомологичная рекомбинация.

Сохраняется неудовлетворенная медицинская потребность в более эффективных видах терапии, например, комбинированной терапии, для лечения раковых заболеваний.

Сущность изобретения

В настоящем документе предложены комбинации: (i) ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа и (ii) ингибитора поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа.

Также в настоящем документе предложены способы лечения субъекта с раком, используя такую комбинацию.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, ранее получавшего лечение первым ингибитором поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP), причем способ включает введение субъекту ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и второго ингибитора PARP, при этом первый и второй ингибиторы PARP являются одинаковыми или разными ингибиторами PARP.

В одном аспекте субъект ранее не получал лечение ингибитором USP1.

В одном аспекте лечение первым ингибитором PARP было прервано или прекращено. В одном аспекте перерыв составляет по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере две недели, по меньшей мере три недели или по меньшей мере четыре недели. В одном аспекте перерыв составляет не более четырех недель.

В одном аспекте у субъекта наблюдалась неприемлемая токсичность и/или неприемлемые нежелательные реакции при лечении первым ингибитором PARP.

В одном аспекте неприемлемая токсичность или нежелательная реакция представляли собой гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения, анемия или нейтропения, пневмонит, диспноэ, лихорадку, кашель, хрипы, радиологическое отклонение, гипертензию, миелодиспластический синдром/острый миелоидный лейкоз (МДС/ОМЛ), тошноту и/или усталость.

В одном аспекте при лечении первым ингибитором PARP доза первого ингибитора PARP была снижена. В одном аспекте доза первого ингибитора PARP была снижена до одной четвертой, одной третьей, одной второй, двух третьих или трех четвертых от дозы до снижения.

В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой олапариб, а доза до снижения составляла 400 мг два раза в день. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой олапариб, а доза после снижения составляла 200 мг два раза в день или 100 мг два раза в день.

В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой нирапариб, а доза до снижения составляла 300 мг один раз в день. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой нирапариб, а доза после снижения составляла 200 мг один раз в день или 100 мг один раз в день.

В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой талазопариб, а доза до снижения составляла 1 мг один раз в день. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой талазопариб, а доза после снижения составляла 0,75 мг один раз в день, 0,5 мг один раз в день или 0,25 мг один раз в день.

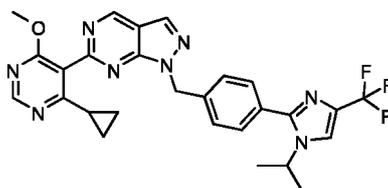
В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой рукапариб, а доза до снижения составляла 600 мг два раза в день. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой рукапариб, а доза после снижения составляла 500 мг два раза в день, 400 мг два раза в день или 300 мг два раза в день.

В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рукапариб. В одном аспекте второй ингибитор PARP представлял собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рукапариб. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой олапариб и второй ингибитор PARP представлял собой олапариб. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой нирапариб и второй ингибитор PARP представлял собой нирапариб. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой талазопариб и второй ингибитор PARP представлял собой талазопариб. В одном аспекте первый ингибитор PARP представлял собой рукапариб и второй ингибитор PARP представлял собой рукапариб.

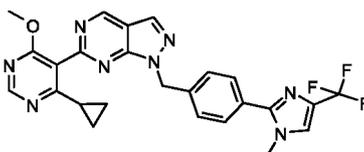
В одном аспекте первый ингибитор PARP и второй ингибитор PARP являются одним и тем же ингибитором PARP. В одном аспекте первый ингибитор PARP и второй ингибитор PARP являются разными ингибиторами PARP. В одном аспекте доза второго ингибитора PARP снижена по сравнению с дозой первого ингибитора PARP.

В одном аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

(a) формулы I



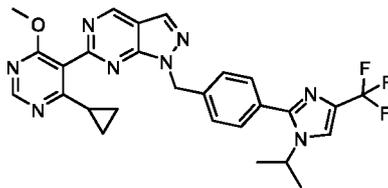
(b) формулы II



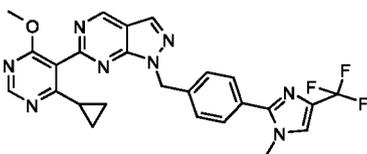
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

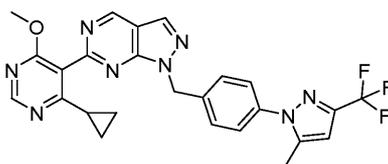
(a) формулы I



(b) формулы II



(c) формулы III



и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP переносятся хорошо.

В одном аспекте ингибитор USP1 снижает воздействие второго ингибитора PARP на субъекта.

В одном аспекте ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP ингибируют рецидив и/или повторный рост ракового заболевания.

В одном аспекте ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP вводятся последовательно. В одном аспекте ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP вводятся одновременно.

В одном аспекте субъект является человеком.

В одном аспекте рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, рака яичников, рака кожи, рака матки, рака брюшины, рака эндометрия и рака молочной железы. В одном аспекте представляет собой рак молочной железы. В одном аспекте рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (triple negative breast cancer - TNBC).

В одном аспекте рак представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак BRCA1 и BRCA2. В одном аспекте рак представляет собой рак яичника. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак p53. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак p53. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и BRCA2. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA2. В одном аспекте рак выбран из группы, состоящей из гемобластоза и лимфатического рака.

В одном аспекте рак содержит клетки с повышенными уровнями RAD51. В одном аспекте повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни белка RAD51. В одном аспекте повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни фокусов белка RAD51.

В одном аспекте по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла в образце, полученном из рака, являются RAD51-положительными. В одном аспекте повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни мРНК RAD51. В одном аспекте повышенные уровни RAD51 были обнаружены перед введением. В одном аспекте способ дополнительно включает обнаружение уровней RAD51 в образце рака, полученном от субъекта, перед введением.

В одном аспекте рак выбран из группы, состоящей из рака, лишённого пути репарации повреждённых ДНК; рака, дефицитного по гомологичной рекомбинации; рака, содержащего раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53; рака, содержащего раковые клетки с мутацией с потерей функции в гене, кодирующем p53; и рака, содержащего клетки с мутацией в гене, кодирующем ATM.

В одном аспекте рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту ингибитора USP1, причем рак содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51. В одном аспекте повышенные уровни RAD51 были обнаружены перед введением.

В одном аспекте способ дополнительно включает обнаружение уровней RAD51 в образце рака, полученном от субъекта. В одном аспекте способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора

PARP в комбинации с ингибитором USP1. В одном аспекте ингибитор PARP представляет собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рупапариб.

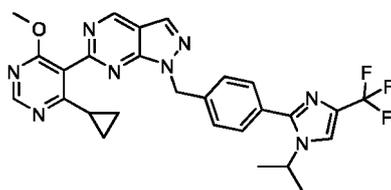
В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу выбора субъекта с раком для лечения ингибитором USP1, включающему обнаружение того, содержит ли рак клетки с повышенными уровнями RAD51, причем если рак содержит клетки с повышенными уровнями RAD51, субъекта выбирают для лечения ингибитором USP1.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу *in vitro* идентификации субъекта с раком как чувствительного к лечению ингибитором USP1, причем способ включает определение уровней RAD51 в образце рака, полученном от субъекта, при этом повышенные уровни RAD51 в образце рака указывают на то, что пациент будет реагировать на лечение ингибитором USP1.

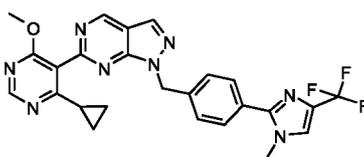
В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению *in vitro* по меньшей мере одного агента, способного специфически обнаруживать RAD51, для идентификации субъекта с раком как чувствительного к лечению ингибитором USP1.

В одном аспекте любого способа или применения, предложенных в настоящем документе, лечение ингибитором USP1 дополнительно включает лечение ингибитором PARP в комбинации с ингибитором USP1. В одном аспекте ингибитор PARP представляет собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рупапариб. В одном аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

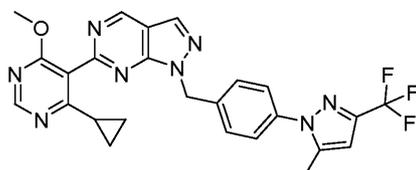
(a) формулы I



(b) формулы II



(c) формулы III

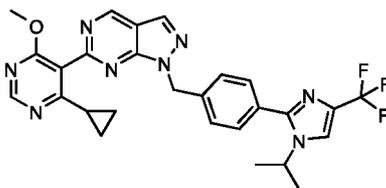


и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

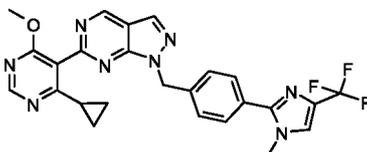
В одном аспекте любого способа или применения, предложенных в настоящем документе, субъект представляет собой человека. В одном аспекте рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, рака яичника, рака кожи, рака матки, рака брюшины, рака эндометрия и рака молочной железы. В одном аспекте рак представляет собой рак молочной железы. В одном аспекте рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В одном аспекте рак представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак BRCA1 и BRCA2. В одном аспекте рак представляет собой рак яичника. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак p53. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак p53. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и BRCA2. В одном аспекте рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA2.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу задержки, уменьшения или предотвращения рецидива опухоли у субъекта, причем способ включает введение субъекту: (i) ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитора поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

(a) формулы I



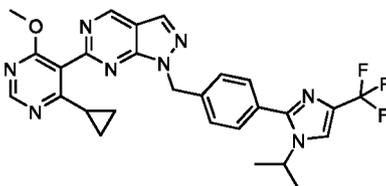
(b) формулы II



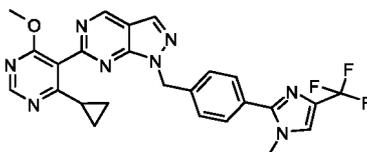
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу задержки, уменьшения или предотвращения рецидива опухоли у субъекта, причем способ включает введение субъекту: (i) ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитора поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

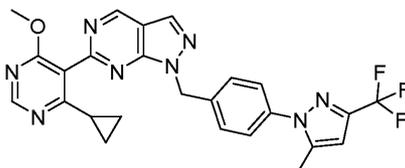
(a) формулы I



(b) формулы II



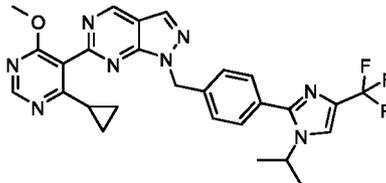
(c) формулы III



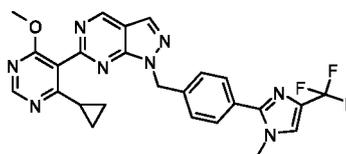
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей: (i) ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитор поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

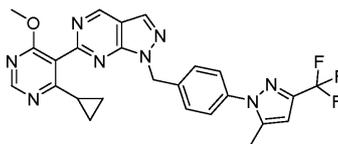
(a) формулы I



(b) формулы II



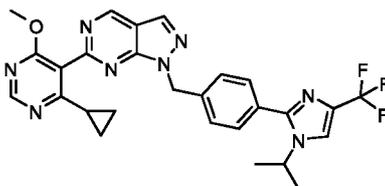
(c) формулы III



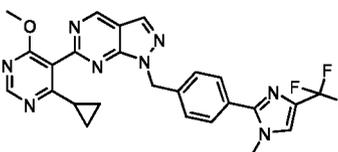
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей: (i) ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитор поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

(a) формулы I



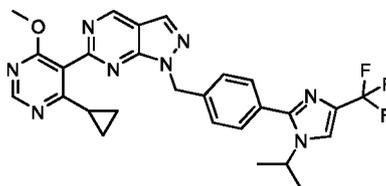
(b) формулы II



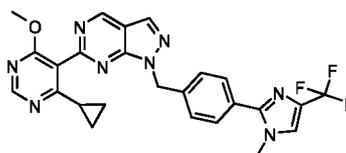
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к комбинированной композиции, содержащей: (i) ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и (ii) ингибитор поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP) или их фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

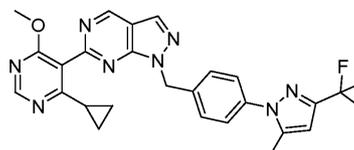
(a) формулы I



(b) формулы II



(c) формулы III



и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В некоторых аспектах ингибитор PARP выбран из группы, состоящей из олапариба (Линпарза®), рукапариба (Рубрака®), нирапариба (Зеюла®) и талазопариба (Талзенна®), а также их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте ингибитор PARP представляет собой нирапариб или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте ингибитор PARP представляет собой олапариб или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В одном аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы III или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению комбинированной композиции для производства лекарственного средства для лечения рака.

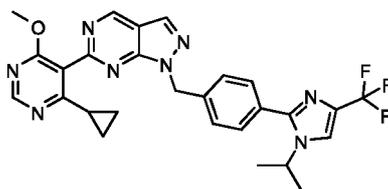
В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинированной композиции, содержащей комбинированную композицию и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте фармацевтическая композиция применяется для лечения рака.

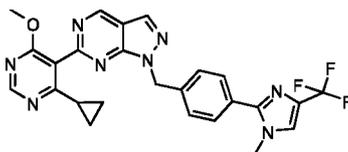
В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему комбинированную композицию или фармацевтическую комбинированную композицию и инструкции по введению комбинации субъекту с раком.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту: (i) ингибитора USP1 и (ii) ингибитора PARP или их фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

(a) формулы I



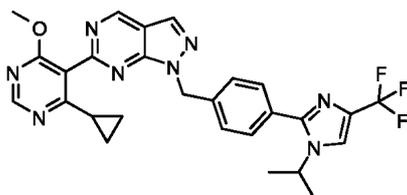
(b) формулы II



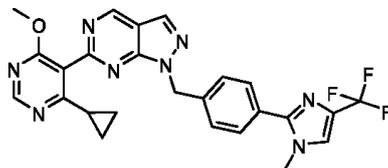
и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту: (i) ингибитора USP1 и (ii) ингибитора PARP или их фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

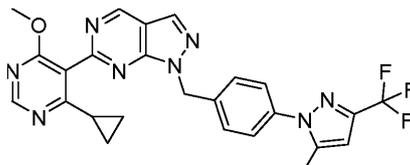
(a) формулы I



(b) формулы II



(c) формулы III



и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В некоторых аспектах способа ингибитор PARP выбран из группы, состоящей из нирапариба, олапариба и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов, сольватов, аморфных твердых веществ или полиморфов.

В одном аспекте способа ингибитор PARP представляет собой нирапариб или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте способа ингибитор PARP представляет собой олапариб или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В одном аспекте способа ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте способа ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В другом аспекте способа ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы III или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

В одном аспекте настоящего изобретения введение ингибитора USP1, или его указанной фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, и ингибитора PARP, или его указанной фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, обеспечивает синергический эффект.

В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят в терапевтически эффективном количестве, достаточном для оказания одного или более терапевтических эффектов, выбранных из группы, состоящей из: (i) уменьшения размера опухоли, (ii) повышения скорости регрессии раковой опухоли, (iii) уменьшения или ингибирования роста раковой опухоли и (iv) уменьшения токсических эффектов ингибитора PARP, вводимого в виде монотерапии. В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят в терапевтически эффективном количестве, достаточном для оказания одного или более терапевтических эффектов, выбранных из группы, состоящей из: (i) уменьшения размера опухоли, (ii) повышения скорости регрессии раковой опухоли и (iii) уменьшения или ингибирования роста раковой опухоли. В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят в количестве, достаточном для уменьшения токсических эффектов ингибитора PARP, вводимого в виде монотерапии.

В одном аспекте ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят в терапевтически эффективном количестве, достаточном для задержки, уменьшения или предотвращения рецидива (быстрого повторного роста) опухоли.

В одном аспекте ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят последовательно.

В другом аспекте ингибитор USP1, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, и ингибитор PARP, или его указанную фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф, вводят одновременно.

В одном аспекте настоящего изобретения комбинацию вводят млекопитающему. В другом аспекте млекопитающее представляет собой человека.

В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из гемобластоза, лимфатического рака, солидной опухоли, рака, лишённого пути репарации повреждений ДНК, и рака, дефицитного по гомологичной рекомбинации.

В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из рака головного мозга, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, рака яичника, рака кожи, рака матки, рака брюшины, рака эндометрия и рака молочной железы.

В некоторых аспектах рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

В некоторых аспектах рак представляет собой рак толстой кишки.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника или рак молочной железы.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак молочной железы.

В некоторых аспектах рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В некоторых аспектах рак выбран из группы, состоящей из рака кости, включая остеосаркому и хондросаркому; рака головного мозга, включая глиому, глиобластому, астроцитому, медуллобластому и менингиому; рака мягких тканей, включая рабдоидную опухоль и саркому; рака почки; рака мочевого пузыря; рака кожи, включая меланому; и рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого; рака

толстой кишки, рака матки; рака нервной системы; рака головы и шеи; рака поджелудочной железы и рака шейки матки.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак, лишенный пути репарации повреждений ДНК.

В некоторых аспектах рак представляет собой мутантный рак BRCA1. В некоторых аспектах мутация BRCA1 представляет собой мутацию зародышевой линии. В некоторых аспектах мутация BRCA1 представляет собой соматическую мутацию. В некоторых аспектах мутация BRCA1 приводит к дефициту BRCA1.

В некоторых аспектах рак представляет собой мутантный рак BRCA2. В некоторых аспектах мутация BRCA2 представляет собой мутацию зародышевой линии. В некоторых аспектах мутация BRCA2 представляет собой соматическую мутацию. В некоторых аспектах мутация BRCA2 приводит к дефициту BRCA2.

В некоторых аспектах рак представляет собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак BRCA2.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA1.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA2.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA1, и рак, дефицитный по BRCA2.

В некоторых аспектах рак представляет собой рефрактерный или устойчивый к ингибитору PARP рак. В некоторых аспектах рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP мутантный рак BRCA1, BRCA2 или BRCA1 и BRCA2. В некоторых аспектах рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак, дефицитный по BRCA1, BRCA2 или BRCA1 и BRCA2.

В некоторых аспектах рак имеет мутацию в гене, кодирующем протеинкиназу, мутированную при атаксии-телеангиэктазии (ataxia telangiectasia mutated - ATM). В некоторых аспектах мутация ATM представляет собой мутацию зародышевой линии. В некоторых аспектах мутация ATM представляет собой соматическую мутацию. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по ATM.

В некоторых аспектах рак содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53. В некоторых аспектах мутация в гене, кодирующем p53, представляет собой мутацию зародышевой линии. В некоторых аспектах мутация в гене, кодирующем p53, представляет собой соматическую мутацию. В некоторых аспектах рак содержит раковые клетки с мутацией с потерей функции в гене, кодирующем p53.

В некоторых аспектах рак имеет мутацию в гене, кодирующем по меньшей мере два из p53, BRCA1, BRCA2 и ATM.

В некоторых аспектах рак содержит клетки с повышенными уровнями RAD51. В некоторых аспектах повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни белка RAD51. В некоторых аспектах повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни фокусов белка RAD51. В некоторых аспектах по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла в образце, полученном из рака, являются RAD51-положительными. В некоторых аспектах повышенные уровни RAD51 представляют собой повышенные уровни мРНК RAD51. В некоторых аспектах повышенные уровни RAD51 были обнаружены перед введением или лечением.

В некоторых аспектах способ или применение, предложенные в настоящем документе, дополнительно включают обнаружение уровней RAD51 в образце рака, полученном от субъекта, перед введением или лечением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения расстройства, опосредованного белком USP1, и/или расстройства, опосредованного белком PARP, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, ингибитора USP1 формулы I или II, или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, и ингибитора PARP, или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, в эффективном количестве для лечения расстройства, опосредованного белком USP1, и/или расстройства, опосредованного белком PARP. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения расстройства, опосредованного белком USP1, и/или расстройства, опосредованного белком PARP, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, ингибитора USP1 формулы I, формулы II или формулы III, или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, и ингибитора PARP, или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата, сольвата, аморфного твердого вещества или полиморфа, в эффективном количестве для лечения расстройства, опосредованного белком USP1, и/или расстройства, опосредованного белком PARP.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования белка USP1 и/или белка PARP, включающему приведение в контакт белка USP1 и/или белка PARP с ингибитором USP1 формулы I или II, или его фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом, аморфным твердым веществом или полиморфом, и ингибитором PARP, или его фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом, аморфным твердым веществом или полиморфом. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования белка USP1 и/или белка PARP, включающему приведение в контакт белка USP1 и/или белка PARP с ингибитором USP1 формулы I, формулы II или формулы III, или его фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом, аморфным твердым веществом или

полиморфом, и ингибитором PARP, или его фармацевтически приемлемой солью, гидратом, сольватом, аморфным твердым веществом или полимером.

В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vitro*.

В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vivo*.

Дополнительные аспекты и преимущества этого изобретения будут изложены частично в нижеприведенном описании, станут очевидны из описания или же они могут быть выявлены при практической реализации этого изобретения. Аспекты и преимущества изобретения будут реализованы и достигнуты посредством элементов и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения.

Следует понимать, что как приведенное выше краткое изложение, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявленное изобретение.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан синергический эффект комбинации ингибитора USP1 формулы II и нирапариба в модели BRCA1 мутантного рака яичника JHOS2.

На фиг. 2 показан синергический эффект комбинации ингибитора USP1 формулы II и нирапариба в модели BRCA1 мутантного рака яичника COV362.

На фиг. 3 показан синергический эффект комбинации ингибитора USP1 формулы II и нирапариба в модели BRCA1 мутантного рака яичника UWB 1.289.

На фиг. 4A и 4B показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме свободного основания по сравнению с олапарибом и нирапарибом у мышей с использованием модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

На фиг. 5A и 5B показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла по сравнению с олапарибом и нирапарибом у мышей с использованием модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

На фиг. 6A, 6B и 6C показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в мышинной ксенотрансплантатной модели опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. На фиг. 6D и 6E показана повышенная противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом на 27 день (последнее измерение перед прекращением введения дозы; фиг. 6D) и на 55 день (через 27 дней после прекращения введения дозы; фиг. 6E) в мышинной модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. На фиг. 6F показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

На фиг. 7A, 7B, 7C, 7D и 7E показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в моделях полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы на голых мышах.

На фиг. 8A, 8B, 8C и 8D показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели молочной железы человека с мутацией BRCA1 и высоким статусом HRD HBCx-11. На фиг. 8A показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 8B и 8C показана активность монотерапии олапарибом в дозе 50 мг/кг (фиг. 8B) и 100 мг/кг (фиг. 8C) у отдельных мышей. На фиг. 8D показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 8E показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в PDX-модели молочной железы человека с мутацией BRCA1 и высоким статусом HRD HBCx-11.

На фиг. 9A, 9B и 9C показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели молочной железы человека с высоким статусом HRD HBCx-14. На фиг. 9A показана активность комбинации по сравнению с монотерапией олапарибом. На фиг. 9B показана активность монотерапии олапарибом в дозе 50 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 9C показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 9D показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в PDX-модели молочной железы человека с высоким статусом HRD HBCx-14.

На фиг. 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F и 10G показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели яичника с мутацией BRCA1 и TP53 OV0589. На фиг. 10A показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 10B показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 10C и 10D показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг (фиг. 10C) и 300 мг/кг (фиг. 10D) у отдельных мышей. На фиг. 10E и 10F показана активность монотерапии олапарибом в дозе 50 мг/кг (фиг. 10E) и 100 мг/кг (фиг. 10F) у отдельных мышей. На фиг. 10G показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 10H показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в PDX-модели яичника с мутацией BRCA1 и TP53 OV0589.

На фиг. 11А показано, что ни один из ингибитора USP1 формулы I, ингибитора PARP олапариба или их комбинации не обладает активностью в PDX-модели яичника с мутацией BRCA1 ST416. На фиг. 11В показана переносимость ингибитора USP1 формулы I, ингибитора PARP олапариба и их комбинации в PDX-модели яичника с мутацией BRCA1 ST416.

На фиг. 12А, 12В, 12С и 12D показано, что ингибитор USP1 формулы I повышает активность ингибитора PARP нирапариба в CDX-модели BRCA1 мутантного TNBC молочной железы человека MDA-MB-436. На фиг. 12А показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 12В и 12С показана активность монотерапии нирапарибом в дозе 20 мг/кг (фиг. 12В) и 50 мг/кг (фиг. 12С) у отдельных мышей. На фиг. 12D показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 12Е показано, что комбинация ингибитора USP1 и ингибитора PARP нирапариба хорошо переносится в CDX-модели BRCA1 мутантного TNBC молочной железы человека MDA-MB-436.

На фиг. 13А, 13В, 13С и 13D показана фармакокинетика межлекарственного взаимодействия комбинации олапариба (фиг. 13А и 13В) и формулы I (фиг. 13С и 13D) у мышей NOD SCID на 1 день (фиг. 13А и 13С) и 5 день (фиг. 13В и 13D).

На фиг. 14 показан синергический эффект комбинации ингибитора USP1 формулы I и олапариба в клетках рака яичника HCT116.

На фиг. 15А, 15В, 15С, 15D, 15Е и 15F показано, что ни один из ингибитора USP1 формулы I, ингибитора PARP олапариба или их комбинации не обладает активностью в PDX-модели яичника CTG-0253. На фиг. 15А показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 15В показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 15С показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 15D показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 300 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 15Е показана активность монотерапии олапарибом в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 15F показана активность комбинации (100 мг/кг олапариба +100 мг/кг формулы I) у отдельных мышей. На фиг. 15G показана переносимость ингибитора USP1 формулы I, ингибитора PARP олапариба и их комбинации в PDX-модели яичника CTG-0253.

На фиг. 16А, 16В, 16С, 16D и 16Е показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели BRCA1 и TP53 мутантного, устойчивого к олапарибу рака HBCx-8. На фиг. 16А показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 16В показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 16С показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 16D показана активность монотерапии олапарибом в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 16Е показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 16F показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в PDX-модели BRCA1 и TP53 мутантного, устойчивого к олапарибу TNBC яичника HBCx8.

На фиг. 17А, 17В, 17С, 17D, 17Е, 17F и 17G показана противоопухолевая активность и переносимость ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели молочной железы с мутацией BRCA2 и TP53 и высоким статусом HRD HBCx-17. На фиг. 17А показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 17В показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в модели HBCx-17. На фиг. 17С показана противоопухолевая активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом (50 мг/кг) в модели HBCx-17. На фиг. 17D показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 17Е показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 17F показана активность монотерапии олапарибом в дозе 50 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 17G показана активность комбинации (олапариб 50 мг/кг и формула I 100 мг/кг) у отдельных мышей. На фиг. 17H показана противоопухолевая активность комбинации ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла с ингибитором PARP олапарибом (100 мг/кг) в модели HBCx-17. На фиг. 17I показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 17J показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 17K показана активность монотерапии олапарибом в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 17L показана активность комбинации (олапариб 100 мг/кг и формула I 100 мг/кг) у отдельных мышей.

На фиг. 18А, 18В, 18С, 18D, 18Е, 18F, 18G, 18H, 18I, 18J, 18K и 18L показана противоопухолевая активность и переносимость ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели яичника с мутацией BRCA1 и TP53 CTG-0703. На фиг. 18А показана активность комбинации по сравнению с монотерапиями. На фиг. 18В показано, что комбинация ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла и ингибитора PARP олапариба хорошо переносится в модели CTG-0703. На фиг. 18С показана противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом (50 мг/кг) в модели CTG-0703. На фиг. 18D показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 18Е показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 18F показана актив-

ность монотерапии олапарибом в дозе 50 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 18G показана активность комбинации у отдельных мышей. На фиг. 18H показана противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом (100 мг/кг) в модели CTG-0703. На фиг. 18I показана активность контрольного носителя у отдельных мышей. На фиг. 18J показана активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 18K показана активность монотерапии олапарибом в дозе 100 мг/кг у отдельных мышей. На фиг. 18L показана активность комбинации у отдельных мышей.

На фиг. 19 показано, что при скринингах устойчивости CRISPR-Cas9 представленность направляющих положительного контроля снизилась, тогда как представленность направляющих нейтрального контроля не снизилась на 4 день (D4), 7 день (D7) и 14 день (D14).

На фиг. 20 показан вулканический график с генами, которые обладают дифференциальной жизнеспособностью при лечении формулой I в форме сокристалла. Данные представляют обогащение клеток MDA-MB-436 на 14 день (D14) по сравнению с 0 днем (D0) после лечения ингибитором USP1 формулы I в форме сокристалла (USP1) и нокаута различных генов (например, RAD18 и UBE2A).

Подробное описание сущности изобретения

Один аспект настоящего изобретения основан на применении комбинации ингибитора белка убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и ингибитора поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP). Комбинации применимы для ингибирования белка USP1 и/или белка PARP, а также для лечения заболеваний, нарушений или состояний, например, рака, которые чувствительны к ингибированию белка USP1 и/или белка PARP.

В некоторых аспектах комбинация ингибитора USP1 и ингибитора PARP обеспечивает синергический эффект.

В некоторых аспектах ингибитор USP1 и ингибитор PARP присутствуют в терапевтически эффективных количествах, достаточных для получения терапевтического эффекта, включающего в себя: (i) уменьшение размера опухоли, (ii) повышение скорости регрессии раковой опухоли, (iii) уменьшение или ингибирование роста раковой опухоли и/или (iv) уменьшение токсических эффектов ингибитора PARP, вводимого в виде монотерапии. В некоторых аспектах ингибитор USP1 и ингибитор PARP могут задерживать, уменьшать или предотвращать рецидив (быстрый повторный рост) опухоли.

Переносимость (отсутствие токсичности) комбинаций, предложенных в настоящем документе, является особенно неожиданной, учитывая, что другие комбинации с ингибитором PARP олапарибом хорошо не переносились; см., например, Samol, J., et al., Invest. New Drugs, 30:1493-500 (2012) ("Further development of olaparib and topotecan in combination was not explored due to dose-limiting hematological AEs and the resulting sub-therapeutic MTD.").

Определения

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В случае противоречия настоящая заявка, включающая определения, будет иметь преимущественную силу. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Все публикации, патенты и другие документы, упомянутые в настоящем документе, тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера. Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из подробного описания и из формулы данного изобретения.

Для дополнительного определения настоящего изобретения предоставлены следующие термины и определения.

Понятно, что варианты осуществления, описанные в настоящем документе, включают в себя "состоящие из" и/или "состоящие по существу из" вариантов осуществления. В контексте настоящего документа слова в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное. Использование термина "или" в настоящем документе не означает, что альтернативные варианты являются взаимоисключающими.

В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если это особо не оговорено или подразумевается специалистом в данной области техники. В контексте пункта патентной формулы, зависящий от другого зависимого пункта, использование "или" относится к более чем одному предшествующему независимому или зависимому пункту.

В контексте настоящего документа термин "и/или" следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения фраз "А и В", "А или В"; "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, термин "и/или" в контексте такой фразы, как "А, В

и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно). В контексте настоящего документа термин "около" включает в себя указанное число $\pm 10\%$. Таким образом, "около 10" означает от 9 до 11. Как понятно специалисту в данной области техники, ссылка на "около" значение или параметр в настоящем документе включает в себя (и описывает) случаи, которые направлены на это значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к "около X", включает в себя описание "X".

Настоящее изобретение охватывает получение и применение солей ингибиторов USP1 и ингибиторов PARP, включая нетоксичные фармацевтически приемлемые соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения включают в себя неорганические и органические соли присоединения кислот и основные соли. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя, помимо прочего, соли металлов, такие как соль натрия, соль калия, соль цезия и т.п.; соли щелочноземельных металлов, такие как соль кальция, соль магния и т.п.; соли органических аминов, такие как соль триэтиламина, соль пиридина, соль пиколина, соль этаноламина, соль триэтанолламина, соль дициклогексиламина, соль N,N'-дибензилэтилендиамина и т.п.; соли неорганических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, фосфат, сульфат и т.п.; соли органических кислот, такие как цитрат, лактат, тартрат, малеат, фумарат, манделат, ацетат, дихлорацетат, трифторацетат, оксалат, формиат и т.п.; сульфонаты, такие как метансульфонат, бензолсульфонат, p-толуолсульфонат и т.п.; и соли аминокислот, такие как аргинат, аспаргинат, глутамат и т.п. В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к любой соли, например, полученной посредством реакции с кислотой или основанием, ингибитора USP1 или ингибитора PARP по настоящему изобретению, которая является физиологически переносимой целевым пациентом (например, млекопитающим, например, человеком).

Соли присоединения кислот могут быть образованы путем смешивания раствора конкретного ингибитора USP1 или ингибитора PARP с раствором фармацевтически приемлемой нетоксичной кислоты, такой как соляная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, уксусная кислота, лимонная кислота, винная кислота, карбоновая кислота, фосфорная кислота, щавелевая кислота, дихлоруксусная кислота и т.п. Основные соли могут быть образованы путем смешивания раствора ингибитора USP1 или ингибитора PARP по настоящему изобретению с раствором фармацевтически приемлемого нетоксичного основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид холина, карбонат натрия и т.п.

В некоторых аспектах изобретения фармацевтически приемлемая соль образуется между соединением формулы I или формулы II и фармацевтически приемлемой кислотой. В некоторых аспектах изобретения фармацевтически приемлемая соль образуется между соединением формулы I, формулы II или формулы III и фармацевтически приемлемой кислотой. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемая кислота выбрана из группы, состоящей из 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, аскорбиновой кислоты, адипиновой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, бензойной кислоты, транс-коричной кислоты, лимонной кислоты, этандисульфоновой кислоты, фумаровой кислоты, галактарной кислоты, галловой кислоты, гентизиновой кислоты, глюконовой кислоты, D-глюкуроновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутаровой кислоты, гликолевой кислоты, гексановой кислоты, гиппуровой кислоты, бромистоводородной кислоты, соляной кислоты, молочной кислоты, малеиновой кислоты, L-яблочной кислоты, малоновой кислоты, R-миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, муциновой кислоты, нафталинсульфоновой кислоты, никотиновой кислоты, щавелевой кислоты, пальмитиновой кислоты, p-толуолсульфоновой кислоты, фосфорной кислоты, пропионовой кислоты, сахарина, салициловой кислоты, стеариновой кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, L-винной кислоты, ванилиновой кислоты и ванилина. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемая кислота выбрана из группы, состоящей из бензойной кислоты, галловой кислоты, гентизиновой кислоты и салициловой кислоты.

Настоящее изобретение охватывает получение и применение сольватов ингибитора USP1 и/или ингибитора PARP. Сольваты обычно существенно не изменяют физиологическую активность или токсичность соединений и, как таковые, могут действовать как фармакологические эквиваленты. В контексте настоящего документа термин "сольват" представляет собой комбинацию, физическую ассоциацию и/или сольватацию ингибитора USP1 и/или ингибитора PARP по настоящему изобретению с молекулой растворителя, такой как, например, дисольват, моносольват или гемисольват, где отношение молекулы растворителя к соединению по настоящему изобретению составляет около 2:1, около 1:1 или около 1:2, соответственно. Эта физическая ассоциация включает различную степень ионной и ковалентной связи, включая водородную связь. В некоторых случаях сольват можно выделить, когда одна или более молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. Таким образом, "сольват" включает в себя как сольваты в фазе раствора, так и выделяемые сольваты. Ингибиторы USP1 и/или ингибиторы PARP по изобретению могут присутствовать в сольватированных формах с фармацевтически приемлемым растворителем, таким как вода, метанол, этанол и т.п., и предполагается, что описание включает в себя как сольватированные, так и несольватированные формы ингибитора USP1 и/или ингибитора PARP по изобретению. Одним из типов сольвата является гидрат. "Гидрат" относится к особой подгруппе сольватов, в которых молекулой растворителя является вода. Сольваты обычно могут

действовать как фармакологические эквиваленты. Приготовление сольватов известно в данной области техники. См., например, M. Caïra et al., *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611 (2004), в котором описано получение сольватов флуконазола с этилацетатом и водой. Подобное получение сольватов, гемисольватов, гидратов и т.п. описано в E.C. van Tonder et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5(1):Article 12 (2004), and A.L. Bingham et al., *Chem. Commun.* 603-604 (2001). Типичный, не ограничивающий процесс получения сольвата включает растворение ингибитора USP1 или ингибитора PARP по изобретению в желаемом растворителе (органическом, воде или их смеси) при температурах от более 20°C до около 25°C с последующим охлаждением раствора со скоростью, достаточной для образования кристаллов, и выделение кристаллов известными способами, например, фильтрацией. Аналитические методы, такие как инфракрасная спектроскопия, могут использоваться для подтверждения присутствия растворителя в кристалле сольвата.

В некоторых аспектах изобретения ингибитор USP1 и/или ингибитор PARP являются дейтерированными. В некоторых аспектах ингибитор USP1 и/или ингибитор PARP являются частично или полностью дейтерированными, т. е. один или более атомов водорода заменены атомами дейтерия.

В контексте настоящего документа термин "лечение" представляет собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. В контексте настоящего документа "лечение" охватывает любое введение или применение терапевтического средства при заболевании у млекопитающего, включая человека. Для целей настоящего изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают в себя, помимо прочего, любой один или более из: облегчения одного или более симптомов, уменьшения степени заболевания, предотвращения или замедления распространения (например, метастазирования) заболевания, предотвращения или замедления рецидива заболевания, задержки или замедления прогрессирования заболевания, облегчения состояния заболевания, ингибирования заболевания или прогрессирования заболевания, ингибирования или замедления заболевания или его прогрессирования, прекращения его развития и ремиссии (как частичной, так и полной). Термин "лечение" также включает в себя уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания. Способы, предложенные в настоящем документе, предусматривают любые один или более из этих аспектов лечения. В соответствии с вышеизложенным, термин "лечение" не требует стопроцентного устранения всех аспектов расстройства.

В контексте рака термин "лечение" включает в себя, помимо прочего, ингибирование роста раковых клеток, ингибирование репликации раковых клеток, уменьшение общей опухолевой нагрузки и задержку, остановку или замедление роста, прогрессирования или метастазирования опухоли.

В контексте настоящего документа "задержка" означает откладывание, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития или прогрессирования заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" вещества может варьироваться в соответствии с такими факторами, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивида, и способности вещества вызывать необходимый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором любые токсические или вредные эффекты вещества перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Терапевтически эффективное количество можно доставить за одно или более введений. Терапевтически эффективное количество относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического эффекта.

Термины "комбинация", "терапевтическая комбинация", "комбинированная композиция", "комбинированная терапия" или "фармацевтическая комбинация" в контексте настоящего документа могут включать в себя фиксированную комбинацию в одной стандартной лекарственной форме, отдельных лекарственных формах или наборе частей или инструкций по комбинированному введению, где ингибитор USP1 и ингибитор PARP могут вводиться независимо в одно и то же время или отдельно через промежутки времени. Комбинированная фармацевтическая композиция может быть адаптирована для одновременного, отдельного или последовательного введения.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергизм" и подтверждает "синергический" эффект, т.е. эффект, достигаемый, когда активные компоненты, используемые вместе, дают больший эффект, чем сумма эффектов, которые приводят к результатам при использовании соединений по отдельности. Синергический эффект может включать в себя значительно сниженную эффективную дозу для комбинации двух активных ингредиентов по сравнению с эффективной дозой каждого активного ингредиента при введении отдельно. Синергический эффект может также включать в себя снижение токсичности для комбинации двух активных ингредиентов по сравнению с токсичностью каждого активного ингредиента при введении отдельно. Синергический эффект может также представлять собой эффект, которого нельзя достичь посредством введения любого из активных ингредиентов в виде отдельных агентов. Синергический эффект может включать в себя, помимо прочего, эффект лечения рака посредством уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или повышения выживаемости субъекта. Синергический эффект может также включать в себя снижение жизнеспособности раковых клеток, индуцирование гибели раковых клеток и ингибирование или задержку роста раковых клеток. Синергический

эффект может быть достигнут, например, когда активные ингредиенты: (1) составлены совместно и вводятся или доставляются одновременно в комбинированной лекарственной форме с однократной дозировкой; (2) доставляются серийно, поочередно или параллельно в виде отдельных составов; или (3) с помощью каких-либо других схем введения. При доставке поочередно синергетический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно.

Определение синергического взаимодействия между ингибитором USP1 и ингибитором PARP может быть основано на результатах, полученных из анализов, описанных в настоящем документе. Например, комбинированные эффекты можно оценить с помощью модели независимости Блисса. Баллы по Блисссу количественно оценивают степень потенциации отдельных агентов, а балл по Блисссу > 0 указывает на больше, чем просто аддитивность. В некоторых аспектах балл по Блисссу более 10 указывает на сильный синергизм. В некоторых аспектах балл 6 или более указывает на синергизм. В некоторых аспектах балл по Блисссу составляет около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20 или около 25.

В контексте настоящего документа "оценка дефицита гомологичной рекомбинации" или "оценка HRD" означает алгоритмическую оценку трех показателей нестабильности генома опухоли, т.е. потери гетерозиготности, теломерного аллельного дисбаланса и крупномасштабных переходов состояний.

Термины "вводить", "процесс введения", "введение" и т.п. относятся к способам, которые можно использовать для обеспечения доставки терапевтического агента в желаемое место биологического действия. Методы введения, которые можно использовать с описанными в настоящем документе агентами и способами, можно найти, например, в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current ed.; Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (current edition), Mack Publishing Co., Easton, Pa. Введение двух или более терапевтических агентов включает в себя одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

Термины "фармацевтический состав" и "фармацевтическая композиция" относятся к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного(ых) ингредиента(ов), и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Такие составы могут быть стерильными.

Термин "фармацевтически приемлемый" в контексте настоящего документа применяется для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

"Фармацевтически приемлемый носитель" обозначает нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал, вспомогательный состав или носитель, общепринятый в данной области техники для применения с терапевтическим средством, что вместе составляет "фармацевтическую композицию" для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель соответствует применяемой композиции.

"Стерильная" композиция является асептической или практически не содержит живых микроорганизмов и их спор.

Термин "контейнер" означает любую емкость и крышку, следовательно, подходящие для хранения, транспортировки, распределения и/или обращения с фармацевтическим продуктом.

Термин "вкладыш" или "листок-вкладыш" означает информацию, сопровождающую фармацевтический продукт, которая предоставляет описание того, как вводить продукт, а также данные о безопасности и эффективности, необходимые для того, чтобы врач, фармацевт и пациент могли принять обоснованное решение относительно использования продукта. Листок-вкладыш обычно рассматривается как "этикетка" для фармацевтического продукта.

Термин "заболевание", или "состояние", или "нарушение" в контексте настоящего документа относится к состоянию, когда лечение необходимо и/или желательно, и обозначает нарушения и/или аномалии, которые обычно считаются патологическими состояниями или функциями и которые могут проявляться в форме определенных признаков, симптомов и/или нарушений. Как показано ниже, комбинации ингибиторов USP1 и ингибиторов PARP по настоящему изобретению могут использоваться для лечения заболеваний и состояний, таких как пролиферативные заболевания, причем ингибирование белков USP1 и/или PARP обеспечивает пользу.

Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают в себя, помимо прочего, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры из аминокислотных остатков. В это определение включены как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Эти термины также включают в себя пост-экспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирова-

ние, сиалилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Кроме того, для целей настоящего изобретения термин "полипептид" относится к белку, который содержит модификации, такие как делеции, добавления и замены (обычно консервативные по природе), в нативной последовательности при условии, что белок поддерживает желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, путем сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций у хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок вследствие ПЦР-амплификации.

Термины "USP1" и "убиквитин-специфическая протеаза 1" в контексте настоящего документа относятся к любому нативному полипептиду или полинуклеотиду, кодирующему USP1. Термин "USP1" включает в себя "полноразмерный" непротессированный полипептид USP1, а также любые формы USP1, которые образуются в результате процессинга внутри клетки (например, удаление сигнального пептида). Термин также включает в себя встречающиеся в природе варианты USP1, например, те, которые кодируются сплайс-вариантами и аллельными вариантами. Описанные в настоящем документе полипептиды USP1 могут быть выделены из различных источников, например, из разных типов тканей человека или из другого источника, или получены рекомбинантными или синтетическими способами. Последовательности USP1 человека известны и включают в себя, например, последовательности, общедоступные в UniProt под номером доступа 094782 (включая изоформы). В контексте настоящего документа термин "белок USP1 человека" относится к белку USP1, содержащему аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1:

```
MPGVIPSESNGLSRGSPSKNRLSLKFFQKKEKTRALDFTDSQENEEKASEYRASEIDQVVPAAQSS
PINCEKRELLPFVGLNNGNTCYLNSILQVLYFCPGFKSGVKHLFNISRKKEALKDEANQKDKG
NCKEDSLASYELICSLQSLIISVEQLQASFLLNPEKYTDELATQPRLLNLTRELNPMYEGYLQHDA
QEVLCILGNIQETCQLLKKEEVKNVAELPTKVEEIPHPKEEMNGINSIEMDSMRHSEDFKEKLPK
GNGKRKSDTEFGNMKKKVKLSKEHQSLLENQRQTRSKRKATSDTLESPPKIIPKYISENESPRPSQK
KSRVKINWLKSATKQPSILSKFCSLGKITTNQGVKGQSKENECDEEDLKGKCESDNTTNGCGLESP
GNTVTPVNVNEVKPINKGEEQIGFELVEKLFQGGQLVLRTRCLECESLTERREDFQDISVPVQDELS
KVEESSEISPEPKTEMKTLRWAIQSOFASVERIVGEDKYFCENCHHYTEAERSLLFDKMPEVITHLK
CFAASGLEFDCYGGGLSKINTPLLTPKLKSLLEEWSTKPTNDSYGLFAVVMHSGITISSGHYATSVKV
TDLNSELDDKGNFVVDQMCEIGKPEPLNEEEARGVVENYNDEEVSIRVGGNTQPSKVLNKKNVEA
IGLLGGQKSKADYELYNKASNPKVASTAFAENRNSETSDTTGTHESDRNKESDQTGINISGFEN
KISYVVQSLKEYEGKWLLFDDSEVKVTEEKDFLNSLSPSTSPYLLFYKKL (SEQ ID NO:1).
```

USP1 представляет собой деубиквитирующий фермент, который действует как часть комплекса с UAF1. "Активность деубиквитиназы" USP1 включает в себя его способность деубиквитинировать как часть комплекса USP1-UAF1.

"PARP" или "белок PARP" в контексте настоящего документа относится к одному или более членам семейства ферментов поли(АДФ-рибоза)полимеразы. Это семейство включает в себя ферменты, которые способны катализировать перенос АДФ-рибозы к белкам-мишеням (поли АДФ-рибозилирование). Существует по меньшей мере 18 членов семейства PARP, которые кодируются различными генами и имеют гомологию в консервативном каталитическом домене, включая PARP-1, PARP-2 и PARP-3.

Термин "специфически связывается" хорошо понятен в данной области техники, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области техники. Считается, что молекула демонстрирует "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она реагирует или ассоциируется более часто, более быстро, более длительно и/или с большей аффинностью с конкретным белком или доменом белка, чем с альтернативными белками или доменами. Следует понимать, что молекула, которая специфически или предпочтительно связывается с первым белком или доменом может специфически или предпочтительно связываться или не связываться со вторым белком или доменом. По существу, "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя оно может включать в себя) исключительного связывания. В общем случае, но не обязательно, ссылка на связывание означает предпочтительное связывание. Например, ингибитор USP1, который специфически связывается с USP1, UAF1 и/или комплексом USP1-UAF1, может не связываться с другими деубиквитиназами, другими белками USP или другими комплексами UAF1 (например, USP46-UAF1) или может связываться с другими деубиквитиназами, другими белками USP или другими комплексами UAF1 (например, USP46-UAF1) со сниженной аффинностью по сравнению со связыванием с USP1.

Термины "снижение", или "снижать", или "ингибирование", или "ингибировать" относятся к уменьшению или прекращению любого фенотипического свойства или к снижению или прекращению частоты, степени или вероятности этого свойства. "Снизить" или "ингибировать" означает уменьшить, снизить или остановить активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. В некоторых вариантах осуществления под "снижением" или "ингибированием" подразумевается способность вызывать общее снижение на 20% или больше. В некоторых вариантах осуществления под "снижением" или "ингибированием" подразумевается способность вызывать общее снижение на 50% или больше. В неко-

торых вариантах осуществления под "снижением" или "ингибированием" подразумевается способность вызывать общее снижение на 75%, 85%, 90%, 95% или больше. В некоторых вариантах осуществления указанное выше количество ингибируется или уменьшается в течение некоторого периода времени относительно контроля в течение того же периода времени.

В некоторых аспектах ингибирование белков USP1 представляет собой ингибирование одной или более активностей или функций белков USP1. Следует понимать, что активность или функция одного или более белков USP1 может ингибироваться *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры активностей и функций USP1 включают в себя активность деубиквитиназы и образование комплекса с UAF1 и описаны в настоящем документе. Примеры уровней ингибирования активности одного или более белков USP1 включают в себя ингибирование на по меньшей мере 10%, ингибирование на по меньшей мере 20%, ингибирование на по меньшей мере 30%, ингибирование на по меньшей мере 40%, ингибирование на по меньшей мере 50%, ингибирование на по меньшей мере 60%, ингибирование на по меньшей мере 70%, ингибирование на по меньшей мере 80%, ингибирование на по меньшей мере 90% и ингибирование вплоть до 100%.

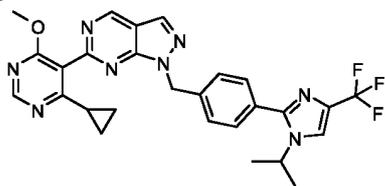
В некоторых аспектах ингибирование белков PARP представляет собой ингибирование одной или более активностей или функций белков PARP. Следует понимать, что активность или функция одного или более белков PARP может ингибироваться *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры активностей и функций PARP описаны в настоящем документе. Примеры уровней ингибирования активности одного или более белков PARP включают в себя ингибирование на по меньшей мере 10%, ингибирование на по меньшей мере 20%, ингибирование на по меньшей мере 30%, ингибирование на по меньшей мере 40%, ингибирование на по меньшей мере 50%, ингибирование на по меньшей мере 60%, ингибирование на по меньшей мере 70%, ингибирование на по меньшей мере 80%, ингибирование на по меньшей мере 90% и ингибирование вплоть до 100%. Термины "индивидуум" или "субъект" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения животного, например, млекопитающего, такого как человек. В некоторых случаях предлагаются способы лечения млекопитающих, включая, помимо прочего, людей, грызунов, обезьян, кошачьих, собак, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, лабораторных животных-млекопитающих, сельскохозяйственных животных-млекопитающих, спортивных животных-млекопитающих и домашних животных-млекопитающих. В некоторых примерах "индивидуум" или "субъект" относится к индивидууму или субъекту, нуждающемуся в лечении заболевания или расстройства. В некоторых случаях субъект, подлежащий лечению, может быть пациентом, указывая на тот факт, что субъект был идентифицирован как имеющий нарушение, подлежащее лечению, или находящийся в группе особого риска заболевания.

В контексте настоящего документа термины "рак" и "опухоль" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Термины охватывают солидную и гематологическую злокачественную/лимфатическую опухоли. Примеры раковых заболеваний включают в себя, помимо прочего, раковые заболевания, лишенные пути репарации повреждений ДНК. Дополнительные примеры раковых заболеваний включают в себя, помимо прочего, рак яичника, рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы), мелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) и остеосаркому. Рак может представлять собой BRCA1 или BRCA2 дикого типа. Рак может также представлять собой BRCA1 или BRCA2 мутантный рак. Рак также может представлять собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак или устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP мутантный рак BRCA1 или BRCA2.

В контексте настоящего документа термин мутация с "потерей функции" относится к мутации, которая приводит к отсутствию гена, снижению экспрессии гена или выработке продукта гена (например, белка), имеющего сниженную активность или отсутствие активности. Мутации с потерей функции включают в себя, например, мутации с изменением смысла, нуклеотидные вставки, нуклеотидные делеции и делеции гена. Мутации с потерей функции также включают в себя доминантно-негативные мутации. Таким образом, раковые клетки с мутацией с потерей функции в гене, кодирующем p53, включают в себя раковые клетки, которые содержат мутации с изменением смысла в гене, кодирующем p53, а также раковые клетки, у которых отсутствует ген, кодирующий p53.

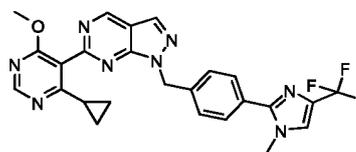
Ингибиторы USP1.

В некоторых аспектах ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) по изобретению содержит соединение



Формулы I:

или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.



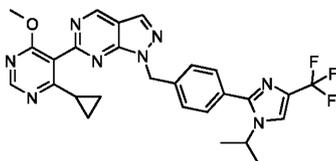
Формулы II:

Химическое название ингибитора USP1 формулы I: 6-(4-циклопропил-6-метоксипиримидин-5-ил)-1-(4-(1-изопропил-4-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил)бензил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин, как описано в заявке США № 16/721079.

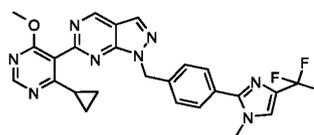
Химическое название ингибитора USP1 формулы II: 6-(4-циклопропил-6-метоксипиримидин-5-ил)-1-(4-(1-метил-4-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил)бензил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин, как описано в заявке США № 16/721079.

Заявка США № 16/721079 полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

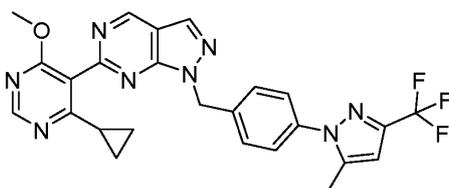
В некоторых аспектах ингибитор убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) по изобретению содержит соединение



Формулы I:



Формулы II:



Формулы III:

или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, аморфное твердое вещество или полиморф.

Химическое название ингибитора USP1 формулы III: 6-(4-циклопропил-6-метоксипиримидин-5-ил)-1-(4-(5-метил-3-(трифторметил)-1H-пиразол-1-ил)бензил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин, как описано в заявке США № 16/721079. Заявка США № 16/721079 полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В различных аспектах ингибиторы USP1 снижают уровень белка USP1 и/или ингибируют или уменьшают по меньшей мере одну биологическую активность белка USP1.

В некоторых аспектах ингибиторы USP1 специфически связываются с белком USP1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 специфически связываются с белком USP1 в комплексе USP1-UAF1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 специфически связываются с мРНК USP1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 специфически связываются с белком USP1 (отдельно или в комплексе USP1-UAF1) или мРНК USP1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 специфически связываются с UAF1 (отдельно или в комплексе USP1-UAF1) и ингибируют или уменьшают образование или снижают активность комплекса USP1-UAF1.

В некоторых аспектах ингибиторы USP1 уменьшают образование комплекса USP1-UAF1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 снижают активность комплекса USP1-UAF1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 снижают активность деубиквитиназы USP1. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 повышают уровень моноубиквитинированного PCNA. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 повышают уровень моноубиквитинированного FANCD2. В некоторых аспектах ингибиторы USP1 повышают уровень моноубиквитинированного FANCI.

В некоторых аспектах ингибиторы USP1 не связываются с другими деубиквитиназами, другими белками USP или другими комплексами UAF1 (например, USP46-UAF1) или связываются с деубиквитиназами, другими белками USP или другими комплексами UAF1 (например, USP46-UAF1) со сниженной в по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 20 раз или по меньшей мере 100 раз аффинностью по сравнению с аффинностью к USP1 (т.е. K_D ингибитора USP1 к другим деубиквитиназам, другим белкам USP или другим комплексам UAF1 (например, USP46-UAF1) в по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 20 раз или по меньшей мере 100 раз выше, чем K_D к USP1).

В некоторых аспектах ингибиторы USP1 ингибируют активность деубиквитиназы USP1 с IC_{50} менее чем около 50 нМ, от около 50 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 2 пМ или выше чем 2 пМ, например, измеренной с помощью анализа, описанного в публикации заявки на патент США № 2017/0145012, или IC_{50} от 50 нМ до 1000 нМ, например, измеренной с помощью анализа, описанного в Liang et al., Nat Chem Biol 10: 289-304 (2014). В некоторых аспектах ингибиторы USP1 ингибируют активность деубиквитиназы USP1 с IC_{50} , измеренной с помощью анализа, описанного в Chen, et al., Chem Biol., 18(11): 1390-1400 (2011). В некоторых аспектах ингибиторы USP1 не ингибируют активность других деубиквитиназ, других белков USP или других комплексов UAF1 (например, USP46-UAF1) или ингибируют активность других деубиквитиназ, других белков USP или других комплексов UAF1 (напри-

Иллюстративные анализы для определения ингибирования USP1.

Любой подходящий анализ в данной области техники можно использовать для определения активности, обнаружения результата или эффекта или определения эффективности; см., например, заявку США № 16/721079. Заявка США № 16/721079 полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых случаях способ определения того, ингибирует ли соединение ингибитора USP1 активность деубиквитиназы USP1, измеряет изменение массы при расщеплении диубиквитином связи деубиквитиназы. Например, убиквитин-альдегид и убиквитин-винилсульфон образуют необратимые ковалентные связи с деубиквитиназами, которые приводят к наблюдаемым изменениям массы деубиквитиназ. Аналогично, расщепление диубиквитинов приводит к наблюдаемому изменению массы.

В некоторых случаях способ определения того, ингибирует ли соединение ингибитора USP1 активность деубиквитиназы USP1, включает увеличение люминесценции или флуоресценции при расщеплении, например, контролируемое с помощью планшет-ридера. В таких анализах может использоваться убиквитин, связанный с флуорофором посредством линкерной связи, такой как убиквитин-7-амино-4-метилкумарин (Ub-AMC) или убиквитин-родамин 110. В таких анализах также может использоваться диубиквитин, содержащий изопептидную связь. Иллюстративные диубиквитины могут содержать флуорофор на одном убиквитине и гаситель на другом убиквитине, так что флуоресценция повышается при расщеплении диубиквитина. В таких анализах также могут использоваться сопряженные ферментные системы, в которых убиквитин сопряжен с ферментом, который будет активным только для выработки продукта флуоресцентного фермента при высвобождении из убиквитина.

Ингибиторы PARP.

В различных аспектах ингибиторы PARP по изобретению снижают уровень одного или более белков PARP и/или ингибируют или уменьшают по меньшей мере одну биологическую активность одного или более белков PARP.

Ингибиторы PARP включают в себя, например, олапариб (Линпарза®), рупапариб (Рубрака®), нирапариб (Зеюла®) и талазопариб (Талзенна®).

В одном аспекте ингибитор PARP представляет собой нирапариб (Зеюла®), который продается как нирапариба тозилата моногидрат. Химическое название нирапариба тозилата моногидрата: 2-{4-[(3S)-пиперидин-3-ил]фенил}-2Ниндазол 7-карбоксамид 4-метилбензолсульфоната гидрат (1:1:1).

Молекулярная формула нирапариба тозилата: $C_{26}H_{30}N_4O_5S$, а его молекулярная масса составляет 492,6 г/моль.

Нирапариб представляет собой ингибитор ферментов поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) PARP-1 и PARP-2, которые играют роль в репарации ДНК. Исследования *in vitro* показали, что вызванная нирапарибом цитотоксичность может включать в себя ингибирование ферментной активности PARP и повышенное образование комплексов PARP-ДНК, что приведет к повреждению ДНК, апоптозу и гибели клеток. Повышенная цитотоксичность, вызванная нирапарибом наблюдалась в линиях опухолевых клеток с дефицитом BRCA1/2 или без него. Нирапариб уменьшал рост опухоли в мышечных ксенотрансплантатных моделях линий раковых клеток человека с дефицитом BRCA1/2 и в опухолевых моделях полученных от пациентов-людей ксенотрансплантатов с дефицитом гомологичной рекомбинации с мутированным BRCA1/2 или BRCA1/2 дикого типа.

В другом аспекте ингибитор PARP представляет собой олапариб (Линпарза®). Химическое название: 4-[(3-[[4-(циклопропилкарбонил)пиперазин-1-ил]карбонил]-4-фторфенил)-метил]фалазин-1(2H)-он. Молекулярная формула: $C_{24}H_{23}FN_4O_3$, а молекулярная масса составляет 434,5 г/моль.

Олапариб представляет собой ингибитор ферментов поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP), включая PARP1, PARP2 и PARP3. Было продемонстрировано, что олапариб ингибирует рост выбранных линий опухолевых клеток *in vitro* и уменьшает рост опухоли в мышечных ксенотрансплантатных моделях рака человека, как в виде монотерапии, так и после химиотерапии на основе платины. Повышенную цитотоксичность и противоопухолевую активность после лечения олапарибом отмечали в линиях клеток и мышечных моделях опухолей с дефицитом BRCA и отличных от BRCA белков, участвующих в репарации путем гомологичной рекомбинации (homologous recombination repair - HRR) повреждения ДНК, и коррелировали с реакцией на платину. Исследования *in vitro* показали, что вызванная олапарибом цитотоксичность может включать в себя ингибирование ферментной активности PARP и повышенное образование комплексов PARP-ДНК, что приведет к повреждению ДНК и гибели раковых клеток.

В одном аспекте ингибиторы PARP используют в противораковых комбинированных терапиях с ингибиторами USP1 по настоящему изобретению. В дополнение к ингибитору PARP и ингибитору USP1 другие виды терапии можно использовать до, во время или после комбинированной терапии.

Иллюстративные анализы для определения ингибирования PARP.

В настоящем изобретении предложены соединения, которые являются активными при ингибировании активности PARP. Любой подходящий анализ в данной области техники можно использовать для определения активности, обнаружения результата или эффекта или определения эффективности; см., например, Dillon, et al., JBS., 8(3), 347-352 (2003); патент США № 9566276. В некоторых аспектах инги-

белка RAD51, повышенные уровни фокусов белка RAD51 и/или повышенный уровень мРНК RAD51.

В настоящем документе предложены различные способы идентификации рака как чувствительного к ингибитору USP1 рака и/или рака, который чувствителен к комбинации ингибиторов USP1 и ингибиторов PARP. В некоторых случаях такие способы включают обнаружение уровней RAD51 (например, белка RAD51, фокусов белка RAD51 и/или мРНК RAD51) в раковых клетках (например, с помощью образца, полученного из рака). Уровни белка RAD51 можно обнаружить с помощью, например, иммунофлуоресценции, вестерн-блотов, сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS) и/или иммуногистохимии. Уровни мРНК RAD51 можно обнаружить, например, с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскриптазой (ОТ). Повышенные уровни белка и/или мРНК RAD51 указывают на то, что рак является чувствительным к ингибиторам USP1 или к комбинациям ингибиторов USP1 и ингибиторов PARP.

Способы обнаружения RAD51 и фокусов белка RAD51 предложены, например, в Castroviejo-Bermejo, Marta, et al., *EMBO Molecular Medicine* 10(12):e9172 (2018), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. RAD51 можно обнаружить, например, с помощью иммунофлуоресценции. Фокусы RAD51, например, диаметром 0,42-1,15 мкм, можно количественно определить на фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) образцах опухолей путем оценки процента клеток в фазе S/G2 клеточного цикла (например, geminin-положительных клеток) с 5 или более ядерными фокусами RAD51. В некоторых аспектах раковые заболевания, содержащие клетки с повышенными уровнями RAD51, представляют собой раковые заболевания, в которых по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла (например, geminin-положительных клеток), являются RAD51-положительными.

В некоторых аспектах способ выбора субъекта с раком для лечения ингибитором USP1 (необязательно в комбинации с ингибитором PARP) включает определение того, содержит ли рак клетки с повышенными уровнями RAD51, причем если рак содержит клетки с повышенными уровнями RAD51, субъекта выбирают для лечения ингибитором USP1, необязательно в комбинации с ингибитором PARP.

Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой рак, дефицитный по гомологичной рекомбинации. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой мутантный рак BRCA1. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой мутантный рак BRCA2. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак BRCA2. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой рак с вредоносными или предполагаемыми вредоносными мутациями в генах BRCA1 и BRCA2 и/или с положительным показателем нестабильности генома, например, определенном с помощью myChoice® CDx (Myriad®).

Способы применения.

Поскольку комбинации по изобретению представляют собой ингибиторы белков USP1 и белков PARP, в настоящем изобретении предложен способ ингибирования белка USP1 и/или белка PARP, включающий приведение в контакт белка USP1 и/или PARP или композиции, содержащей белок USP1 и/или PARP, с одной или более комбинациями по изобретению.

Поскольку комбинации по изобретению представляют собой ингибиторы белков USP1 и PARP, ряд заболеваний, состояний или нарушений, опосредованных белками USP1 и/или PARP, можно лечить путем применения этих соединений. Настоящее изобретение, таким образом, направлено в общем случае на способ лечения заболевания, состояния или нарушения, чувствительного к ингибированию белков USP1 и/или PARP, у животного, страдающего от или подверженного риску заболевания, причем способ включает в себя введение животному эффективного количества одной или более комбинаций по изобретению.

Настоящее изобретение также направлено на способ ингибирования белков USP1 и/или PARP у животного, нуждающегося в этом, причем способ включает введение животному терапевтически эффективного количества комбинации по изобретению.

В некоторых аспектах комбинации по изобретению можно использовать для ингибирования активности белка USP1 и/или PARP. Например, в некоторых аспектах способ ингибирования белка USP1 и/или PARP включает приведение в контакт белка USP1 и/или PARP с комбинацией по изобретению. Приведение в контакт может происходить *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых аспектах комбинации по изобретению можно использовать для лечения нарушения, опосредованного белком USP1 и/или PARP. Нарушение, опосредованное белком USP1 и/или PARP, представляет собой любое патологическое состояние, в котором белок USP1 и/или PARP, как известно, играет роль. В некоторых аспектах нарушение, опосредованное USP1 и/или PARP, представляет собой пролиферативное заболевание, такое как рак. В некоторых аспектах комбинации по изобретению могут задерживать, уменьшать или предотвращать рецидив (быстрый повторный рост) опухоли. В некоторых аспектах комбинация по изобретению не является значительно более токсичной, чем ингибитор USP1 сам по себе. В некоторых аспектах комбинация по изобретению не является значительно более токсичной, чем ингибитор PARP сам по себе. В некоторых аспектах комбинация по изобретению не является значительно более токсичной, чем ингибитор USP1 сам по себе или ингибитор PARP сам по себе.

В некоторых аспектах комбинация по изобретению является менее токсичной, чем ингибитор PARP сам по себе. Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ лечения

рака у субъекта, ранее получавшего лечение первым ингибитором поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP), причем способ включает введение субъекту ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и второго ингибитора PARP, при этом первый и второй ингибиторы PARP являются одинаковыми или разными ингибиторами PARP. Лечение первым ингибитором PARP могло быть прервано или прекращено, например, в результате неприемлемой токсичности и/или неприемлемых нежелательных реакций. Примеры токсичности или нежелательных реакций включают в себя гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения, анемия или нейтропения, пневмонит, диспноэ, лихорадку, кашель, хрипы, радиологическое отклонение, гипертензию, миелодиспластический синдром/острый миелоидный лейкоз (МДС/ОМЛ), тошноту и/или усталость.

В некоторых аспектах перерыв в лечении первым ингибитором PARP составлял по меньшей мере одну неделю, необязательно от одной недели до четырех недель. В некоторых аспектах перерыв составлял по меньшей мере две недели, необязательно от двух недель до четырех недель. В некоторых аспектах перерыв составлял по меньшей мере три недели, необязательно от трех недель до четырех недель. В некоторых аспектах перерыв составлял по меньшей мере четыре недели. В некоторых аспектах перерыв составлял не более четырех недель.

В некоторых аспектах доза первого ингибитора PARP была снижена, например, снижена до одной четвертой, одной третьей, одной второй, двух третьих или трех четвертых от дозы до снижения. Первый ингибитор PARP может представлять собой олапариб, а доза до снижения может составлять 400 мг два раза в день. Такая доза может быть снижена, например, до 200 мг два раза в день или 100 мг два раза в день. Первый ингибитор PARP может представлять собой нирапариб, а доза до снижения может составлять 300 мг один раз в день. Такая доза может быть снижена, например, до 200 мг один раз в день или 100 мг один раз в день. Первый ингибитор PARP может представлять собой талазопариб, а доза до снижения может составлять 1 мг один раз в день. Такая доза может быть снижена, например, до 0,75 мг один раз в день, 0,5 мг один раз в день или 0,25 мг один раз в день. Первый ингибитор PARP может представлять собой рукапариб, а доза до снижения может составлять 600 мг один раз в день. Такая доза может быть снижена, например, до 500 мг два раза в день, 400 мг два раза в день или 300 мг два раза в день.

В настоящем документе предложены различные способы лечения заболеваний и расстройств с помощью комбинаций по изобретению. Примеры заболеваний и расстройств, которые можно лечить комбинациями по изобретению, включают в себя, помимо прочего, рак.

В некоторых аспектах предложены способы лечения рака комбинациями по изобретению. Такие способы включают введение субъекту с раком терапевтически эффективного количества комбинации по изобретению.

В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, выбран из гемобластома, лимфатического рака и рака, лишенного пути репарации повреждений ДНК. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с мутацией потери функции в гене, кодирующем p53. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем BRCA1. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем BRCA2. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с мутацией потери функции в гене, кодирующем ATM.

В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, выбран из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), остеосаркомы, рака яичника и рака молочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой рак матки. В некоторых аспектах рак представляет собой рак брюшины. В некоторых аспектах рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника или рак молочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника. В некоторых аспектах рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой рак яичника. В некоторых аспектах рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак p53. В некоторых аспектах рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак p53. В некоторых аспектах рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1 и BRCA2. В некоторых аспектах рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA2.

В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, представляет собой рак, который содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51. Повышенные уровни RAD51 могут представлять собой повышенные уровни белка RAD51, повышенные уровни фокусов белка RAD51 и/или повышенные уровни мРНК RAD51. В некоторых аспектах рак, который содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51, относится к раку, в котором по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла (например, geminin-положительных клеток), в образце, полученном из рака, являются RAD51-положительными (например, содержат 5 или более ядерных фокусов RAD51).

Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой рак, дефицитный по гомологичной рекомбинации. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак BRCA1 и BRCA2. Рак с повышенными уровнями RAD51 может представлять собой рак с вредоносными или предполагаемыми вредоносными мутациями в генах BRCA1 и BRCA2 и/или с положительным показателем нестабильности генома, например, определенном с помощью *my Choice*® CDx (*Myriad*®).

В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, выбран из группы, состоящей из рака кости, включая остеосаркому и хондросаркому; рака головного мозга, включая глиому, глиобластому, астроцитому, медуллобластому и менингиому; рака мягких тканей, включая рабдоидную опухоль и саркому; рака почки; рака мочевого пузыря; рака кожи, включая меланому; и рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого; рака толстой кишки, рака матки; рака нервной системы; рака головы и шеи; рака поджелудочной железы и рака шейки матки. В некоторых аспектах рак, подлежащий лечению комбинацией по изобретению, выбран из группы, состоящей из рака матки, рака брюшины и рака эндометрия.

В настоящем документе предложены различные способы лечения рака с помощью комбинации по изобретению. В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество комбинации по изобретению вводят субъекту с раком.

В некоторых аспектах такие способы включают: (a) идентификацию рака у субъекта как чувствительного к ингибиторам USP1 и/или PARP рака, а затем (b) введение терапевтически эффективного количества комбинации по изобретению субъекту.

В некоторых аспектах такие способы включают введение субъекту с трижды негативным раком молочной железы терапевтически эффективного количества комбинации по изобретению. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой рак, дефицитный по гомологичной рекомбинации. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак содержит раковые клетки с мутацией потери функции в гене, кодирующем p53. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, который не несет дефекта в пути гомологичной рекомбинации.

В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой мутантный рак BRCA1. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой мутантный рак BRCA2. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой мутантный рак BRCA1 и мутантный рак BRCA2. В некоторых аспектах рак не является мутантным раком BRCA1 или мутантным раком BRCA2. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA1. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA2. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по BRCA1, и мутантный рак BRCA2. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой мутантный рак ATM. В некоторых аспектах рак не является мутантным раком ATM. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, дефицитный по ATM.

В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак. В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют для лечения рака, причем рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак, дефицитный по BRCA1.

В некоторых аспектах рак представляет собой мутантный рак BRCA1 и/или BRCA2, причем рак содержит клетки с повышенными уровнями RAD18, например, где повышенные уровни RAD18 являются по меньшей мере такими же высокими, как уровни белка и/или мРНК RAD18 в клетках ES2 (клетки ES2 являются общедоступными, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC; CRL-1978)), или где повышенные уровни RAD18 выше, чем уровни белка и/или мРНК RAD18 в клетках HEP3B217 (клетки HEP3B217 являются общедоступными, например, из ATCC (HB-8064)). В некоторых аспектах трижды негативный рак молочной железы представляет собой мутантный рак BRCA1 и/или BRCA2.

В некоторых аспектах рак представляет собой рак, который содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51, например, повышенными уровнями белка RAD51, повышенными уровнями фокусов белка RAD51 и/или повышенными уровнями мРНК RAD51. В некоторых аспектах рак, который содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51, относится к раку, в котором по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла (например, *geminin*-положительных клеток), в образце, полученном из рака, являются RAD51-положительными (например, содержат 5 или более ядерных фокусов RAD51).

В некоторых случаях рак представляет собой солидный рак. В некоторых случаях рак представляет собой гемобластоз/лимфатический рак. В некоторых случаях рак представляет собой рак, лишенный пути репарации повреждений ДНК. В некоторых случаях рак представляет собой рак, дефицитный по го-

мологичной рекомбинации. В некоторых случаях рак содержит раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53. В некоторых случаях рак содержит раковые клетки с мутацией потери функции в гене, кодирующем p53. В некоторых случаях рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), остеосаркомы, рака яичника и рака молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы). В некоторых случаях рак представляет собой рак яичника или рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы). В некоторых случаях рак представляет собой рак яичника. В некоторых случаях рак представляет собой рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы). В некоторых случаях рак представляет собой рак матки. В некоторых случаях рак представляет собой рак брюшины. В некоторых случаях рак представляет собой рак эндометрия.

В некоторых аспектах комбинацию по изобретению используют в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены комбинации по изобретению для применения в качестве лекарственного препарата или для применения при производстве лекарственного препарата, например, для лечения рака. В некоторых аспектах в настоящем документе предложены комбинации по изобретению для применения в способе лечения рака. В некоторых аспектах предложены способы лечения раковых заболеваний, содержащих клетки с повышенными уровнями RAD51. Раковые заболевания, содержащие клетки с повышенными уровнями RAD51, могут называться в настоящем документе "раковые заболевания с высоким уровнем RAD51". Такие способы включают введение субъекту с раковым заболеванием с высоким уровнем RAD51 терапевтически эффективного количества ингибитора USP1 или комбинации ингибитора USP1 и ингибитора PARP.

В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51, подлежащий лечению ингибитором USP1 или комбинацией ингибитора USP1 и ингибитора PARP, выбран из гемобластоза, лимфатического рака и рака, лишенного пути репарации повреждений ДНК. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51, подлежащий лечению ингибитором USP1 или комбинацией ингибитора USP1 и ингибитора PARP, представляет собой рак, дефицитный по гомологичной рекомбинации.

В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51, подлежащий лечению ингибитором USP1 или комбинацией ингибитора USP1 и ингибитора PARP, выбран из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), остеосаркомы, рака яичника и рака молочной железы. В некоторых аспектах рак представляет собой рак матки. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак брюшины. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак эндометрия. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак яичника или рак молочной железы. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак яичника. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак молочной железы. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51 представляет собой рак яичника.

В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51, подлежащий лечению ингибитором USP1 или комбинацией ингибитора USP1 и ингибитора PARP, выбран из группы, состоящей из рака кости, включая остеосаркому и хондросаркому; рака головного мозга, включая глиому, глиобластому, астроцитому, медуллобластому и менингиому; рака мягких тканей, включая рабдоидную опухоль и саркому; рака почки; рака мочевого пузыря; рака кожи, включая меланому; и рака легкого, включая немелкоклеточный рак легкого; рака толстой кишки, рака матки; рака нервной системы; рака головы и шеи; рака поджелудочной железы и рака шейки матки. В некоторых аспектах рак с высоким уровнем RAD51, подлежащий лечению ингибитором USP1 или комбинацией ингибитора USP1 и ингибитора PARP, выбран из группы, состоящей из рака матки, рака брюшины и рака эндометрия. В настоящем документе предложены различные способы лечения рака с высоким уровнем RAD51 с помощью комбинации по изобретению. В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество комбинации по изобретению вводят субъекту с раком с высоким уровнем RAD51.

В некоторых аспектах такие способы включают: (а) обнаружение уровней RAD51 (например, белка RAD51 и/или мРНК RAD51) в раковых клетках (например, в образце рака, полученном у субъекта), а затем (б) введение терапевтически эффективного количества ингибитора USP1 субъекту, имеющему рак, содержащий клетки с повышенными уровнями RAD51. В некоторых аспектах такие способы включают: (а) обнаружение уровней RAD51 (например, белка RAD51 и/или мРНК RAD51) в раковых клетках (например, в образце рака, полученном у субъекта), а затем (б) введение ингибитора USP1 в комбинации с ингибитором PARP субъекту, имеющему рак, содержащий клетки с повышенными уровнями RAD51.

Фармацевтические комбинированные композиции.

Комбинации по изобретению могут вводить млекопитающему в виде чистого химического вещества без каких-либо других присутствующих компонентов, или комбинации по изобретению также могут вводить млекопитающему как часть фармацевтической композиции, содержащей соединение, объединенное с подходящим фармацевтически приемлемым носителем (см., например, Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)). Такой носитель

может быть выбран из фармацевтически приемлемых эксципиентов и вспомогательных веществ. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемая несущая среда" охватывает любые стандартные фармацевтические носители, растворители, поверхностно-активные вещества или несущие среды. Стандартные фармацевтические носители и их составы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed. 1995.

Фармацевтическая комбинированная композиция по настоящему изобретению может быть получена в виде жидких суспензий или растворов с применением жидкости, такой как масло, вода, спирт и их комбинаций.

Фармацевтические комбинированные композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации, например, через мембраны для стерильной фильтрации.

Фармацевтические комбинированные композиции, входящие в объем настоящего изобретения, включают все композиции, где ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению объединены с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В одном варианте осуществления ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению присутствуют в композиции в количестве, которое является эффективным для достижения предполагаемой терапевтической цели.

Фармацевтическую комбинированную композицию по настоящему изобретению могут вводить любому пациенту, который может испытывать полезные эффекты комбинации по изобретению. В первую очередь среди таких пациентов находятся млекопитающие, например, люди и домашние животные, хотя настоящее изобретение не предназначено для такого ограничения. В одном аспекте пациент представляет собой человека. В другом аспекте фармацевтическую комбинированную композицию по настоящему изобретению могут вводить пациенту, имеющему устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак. В другом варианте осуществления фармацевтическую комбинированную композицию по настоящему изобретению могут вводить пациенту, имеющему устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак, дефицитный по BRCA1. В другом варианте осуществления фармацевтическую комбинированную композицию по настоящему изобретению могут вводить пациенту, имеющему рак, который содержит раковые клетки с повышенными уровнями RAD51, например, повышенными уровнями белка RAD51, повышенными уровнями фокусов белка RAD51 и/или повышенными уровнями мРНК RAD51. В некоторых аспектах фармацевтическую комбинированную композицию по настоящему изобретению могут вводить пациенту, имеющему рак, в котором по меньшей мере 10% клеток, которые находятся в фазе S/G2 клеточного цикла (например, *geminin*-положительных клеток), в образце, полученном из рака, являются RAD51-положительными (например, содержат 5 или более ядерных фокусов RAD51).

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложены наборы, которые содержат комбинацию по изобретению, упакованную таким образом, чтобы облегчить их использование при применении способов по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления такой набор содержит ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, упакованные в контейнер, такой как герметичная бутылка или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенной в набор, которая описывает использование соединений при применении способов по изобретению. В одном варианте осуществления комбинированная композиция упакована в виде стандартной лекарственной формы. Набор дополнительно может содержать устройство, подходящее для введения комбинированной композиции в соответствии с предполагаемым путем введения. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен набор, который содержит ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и инструкции по введению соединений, или их фармацевтически приемлемых солей или сольватов, пациенту, имеющему рак.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая комбинированная композиция, содержащая ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая комбинированная композиция, содержащая ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и фармацевтически приемлемый носитель, причем комбинация связывается с белком, кодируемым геном USP1 и/или геном PARP.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая комбинированная композиция, содержащая ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и фармацевтически приемлемый носитель, причем фармацевтическая композиция предназначена для использования при лечении рака.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена фармацевтическая комбинированная композиция, содержащая ингибитор USP1 и ингибитор PARP по изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, и фармацевтически приемлемый носитель, причем фармацевтическая композиция предназначена для производства лекарственного препарата для лечения рака.

Примеры

Пример 1. Анализы *in vitro*.

Анализ колониеобразования.

Эксперименты *in vitro* проводили с помощью анализа колониеобразующих единиц (КОЕ) на различных клеточных линиях. Анализ КОЕ включал сначала определение того, какая плотность засева клеток обеспечивала рост четко диспергированных колоний на шестилуночной планшете, когда их оставляли расти в течение около 14 дней. После того как определяли эту плотность, клетки высевали на -1 день и 0 день, лунки обрабатывали DMSO или возрастающими концентрациями ингибитора USP1 или нирапариба (3 нМ, 10 нМ, 30 нМ, 100 нМ и 300 нМ) или возрастающими концентрациями ингибитора USP1 или олапариба (3 нМ, 10 нМ, 30 нМ, 100 нМ и 300 нМ). Среду заменяли на 8 день на среду, содержащую соответствующие концентрации DMSO, ингибитора USP1, нирапариба или олапариба. Примерно на 14 день, когда четко диспергированные колонии становились видимыми в обработанных DMSO лунках, клетки фиксировали и окрашивали с помощью 0,1% кристаллического фиолетового в 10% этаноле в течение 20 минут при комнатной температуре. Получали изображения планшетов, а затем количество кристаллического фиолетового в каждой лунке определяли путем экстракции кристаллического фиолетового в 10% уксусную кислоту и измеряли поглощение при 565 нм. Результаты КОЕ показаны в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Клеточная линия	Орган	Число повторов	Распознавание вручную ATM	Распознавание вручную BRCA1	Распознавание вручную BRCA2	Автоматическое распознавание TP53	IC50 формулы П (нМ)	IC50 нирапа (нМ)	Баллы по Блису
HS695T	кожа	1	Потеря функции				> 300	36,9	Н/Д
BICR6	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	149	Н/Д
143B	кость	1					> 300	> 300	Н/Д
22RV1	предстательная железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
ASPC1	поджелудочная железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
BICR56	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
BT474	молочная железа	1			Возможная потеря функции		> 300	> 300	Н/Д
ECGI10	пищевод	1					> 300	> 300	Н/Д
HCC95	легкое	1					> 300	> 300	Н/Д
HS821T	кость	1					> 300	> 300	Н/Д
HS934T	меланома	1					> 300	> 300	Н/Д
HUO3N1	кость	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
MG63	кость	1					> 300	> 300	Н/Д
NCIH1648	легкое	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
NCIH1838	легкое	1	Возможная потеря функции				> 300	> 300	Н/Д
NCIH838	легкое	1					> 300	> 300	Н/Д

OE19	пищевод	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
OVK18	яичник	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
SNGM	матка	2	ДТ				> 300	> 300	Н/Д
SNU1076	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
SNU213	поджелудочная железа	1					> 300	> 300	Н/Д
T174	молочная железа	1					> 300	> 300	Н/Д
TCCSUP	мочевой пузырь	1					> 300	> 300	Н/Д
VMRCRCZ	почка	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	> 300	Н/Д
MSTO211H	легкое	1					> 300	> 300	25,4
NCIH520	легкое	1					> 300	> 300	20,3
SUM149PT	молочная железа	1			Потеря функции		> 300	135	18,1
DOTC24510	шейка матки	1					> 300	30,4	18
JHOS2	яичник	1					> 300	> 300	17,8
SNUC4	толстая кишка	1			Возможная потеря функции		> 300	> 300	17,4

HCC1806	молочная железа	2				Потеря функции	114	62,9	16,7
COV362	яичник	3	Возможная потеря функции	Возможная потеря функции			> 300	177	16,3
RERFLCAI	легкое	1					> 300	> 300	16,1
CW2	толстая кишка	2			Возможная потеря функции		> 300	> 300	15,3
BICR78	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	15
GOTO	нервная система	1					> 300	22,4	14,2
SNU668	желудок	1		Возможная потеря функции			> 300	> 300	13,4
TE11	пищевод	2					134	176	13,1
HCC2108	легкое	1				Потеря функции	> 300	95,5	12,8
HCT116	толстая кишка	2			Возможная потеря функции		110	> 300	12,7
UWB1289BRCA1	яичник	1					139	186	12,3
HPAC	поджелудочная железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	12,2

HBCx8	молочная железа	1					> 300	107	12,1
SKES1	кость	2					> 300	23,6	11,9
SNU119	яичник	1					> 300	39	11,3
SNU407	толстая кишка	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	72,8	11,3
A2058	кожа	1					> 300	58,4	11,2
NCIH1915	легкое	2				Потеря функции	52,2	66,2	10,5
KM12	толстая кишка	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	220	106	10,5
SUIT2	поджелудочная железа	1					> 300	> 300	9,98
COV434	яичник	1					> 300	106	9,79
JMT1	молочная железа	1					16,6	25,3	9,34
HCC1395	молочная железа	3			Потеря функции		> 300	8,26	18
PK45H	поджелудочная железа	1					294	> 300	8,17
SKOV3_BRC A1null	яичник	1					> 300	262	8,11

HCC19 54	молочная железа	2		Возможная потеря функции			> 300	> 300	4
HEC15 1	эндометрий	1					> 300	> 300	7,76
CHAG OK1	легкое	1					> 300	> 300	7,72
NCIH1 573	легкое	1					227	15,2	7,47
HT115	толстая кишка	1		Возможная потеря функции		Потеря функции	150	15,6	7,45
LU99	легкое	1					35,4	88,6	7,23
RKO	толстая кишка	1			Возможная потеря функции		> 300	> 300	7,15
HPAFI I	поджелудочная железа	2					> 300	> 300	6,99
HCC14 38	легкое	1				Потеря функции	> 300	42,5	6,98
LNCA P	предстательная железа	1					> 300	> 300	6,87
A2780	яичник	1					> 300	> 300	6,77
NCIH1 651	легкое	1					85,7	32,4	6,7
FADU	голова и шея	2			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	> 300	6,67
NCIH1 373	легкое	2				Потеря функции	> 300	> 300	6,43

UWB1 289	яичник	4		Потеря функции		Потеря функции	22,3	28,4	6,41
SNU81	толстая кишка	1			Потеря функции	Потеря функции	10,2	18,6	6,25
KU191 9	мочево й пузырь	2					25	181	6,16
NCIH1 693	легкое	4			Возможная потеря функции	Потеря функции	12,7	> 300	5,96
KYSE 270	пищев о д	3				Потеря функции	> 300	16,9	5,86
UBLC 1	мочево й пузырь	1					> 300	> 300	5,72
HCT15	толстая кишка	1			Потеря функции	Потеря функции	> 300	> 300	5,7
SKOV 3	яичник	2	ДТ			Потеря функции	> 300	> 300	5,62
HSC2	голова и шея	3				Потеря функции	> 300	> 300	5,5
HCC20 2	молочн ая железа	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	103	5,41
OVMA NA	яичник	1					> 300	> 300	5,39
HOS	кость	1					> 300	> 300	5,35
VMRC RCW	почка	1				Потеря функции	> 300	> 300	5,27
RT112 84	мочево й пузырь	1					> 300	> 300	5,11

HCC15 69	молочная железа	1			ДТ	Потеря функции	> 300	97,3	4,76
KS1	нервная система	1	ДТ				> 300	> 300	4,65
PK8	поджелудочная железа	1					> 300	> 300	4,57
KYSE 410	пищевод	1					> 300	> 300	4,29
HBCx6	молочная железа	1					> 300	30,4	4,28
HBCx9	молочная железа	1					> 300	55,8	4,1
OVSA HO	яичник	2				Потеря функции	> 300	> 300	3,91
HT144	кожа	2	Потеря функции				84,3	114	3,84
RT112	мочевой пузырь	1					> 300	> 300	3,82
TGBC ITKB	желчные протоки	1				Потеря функции	> 300	> 300	3,82
SKOV 3_AT Mnull	яичник	1					> 300	> 300	3,81

HBCx1 7	молочная железа	1					> 300	13,8	3,69
DMS5 3	легкое	1					> 300	168	3,62
ССК81	толстая кишка	1					> 300	> 300	3,46
647V	мочевой пузырь	2	Возможная потеря функции			Потеря функции	33,9	96,7	3,37
YKG1	нервная система	1					> 300	> 300	3,15
HMC1 8	молочная железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	3,09
HCC15 00	молочная железа	1	Потеря функции				> 300	61,1	2,78
HCC19 37	молочная железа	2				Потеря функции	> 300	244	2,76
TE9	пищевод	1			ДТ	Потеря функции	> 300	> 300	2,24
NOS1	кость	1					> 300	> 300	2,13
SNU48 9	нервная система	1				Потеря функции	> 300	> 300	2,11
SKOV 3_OR1 aInull	яичник	1					> 300	> 300	1,95

CAOV 3	яичник	2	Возможна я потеря функции			Потеря функции	27,8	241	1,72
SN12C	почка	1				Потеря функции	64,7	> 300	1,62
SNU62 6	нервна я систем а	1				Потеря функции	> 300	> 300	1,28
U2OS	кость	1					> 300	> 300	1,2
MDA MB231	молочн ая железа	2					> 300	> 300	1,18
SAOS2	кость	1					> 300	201	1,16
SJSA1	кость	1					> 300	> 300	1,14
PECA PJ49	голова и шея	1					> 300	> 300	1,01
UMUC 3	мочево й пузырь	2	Возможна я потеря функции				> 300	> 300	0,963
SCC15	голова и шея	1				Потеря функции	28	> 300	0,8
CAPA N2	поджел удочна я железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	0,487
HT108 0	мягкие ткани	1					> 300	> 300	0,272
KYSE 140	пищев о д	1					> 300	> 300	0,262
KP3	поджел удочна я железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	0,101

KURA MOCH I	яичник	1			Возможная потеря функции		> 300	> 300	0
CFPA C1	поджел удочна я железа	1					> 300	> 300	- 0,196
GB1	нервна я систем а	1					> 300	> 300	- 0,279
NCIH1 299	легкое	2					> 300	> 300	- 0,395
SNU8	яичник	1				Потеря функции	> 300	> 300	- 0,397
LUDL U1	легкое	1					> 300	> 300	- 0,536
CAPA N1	поджел удочна я железа	4			Возможная потеря функции		> 300	185	-1
OV56	яичник	2				Потеря функции	> 300	> 300	- 0,581
RL952	матка	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	> 300	- 0,807
ES2	яичник	3					27,5	> 300	- 0,904
TE5	пищев од	1					> 300	> 300	-0,91
HSC3	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	- 0,935

MDA MB436	молочная железа	12		Потеря функции		Потеря функции	6,46	4,73	- 0,986
KALS I	нервная система	1					> 300	> 300	-1,03
JNH7	печень	1					> 300	> 300	-1,07
HEC1 B	матка	1					> 300	> 300	-1,47
PECA PJ15	голова и шея	1					> 300	> 300	-1,48
AN3C A	матка	1				Потеря функции	> 300	101	-1,93
SKME L24	кожа	1	Возможная потеря функции				> 300	> 300	-1,93
T226	молочная железа	1					> 300	> 300	-1,97
QGP1	поджелудочная железа	1				Потеря функции	> 300	> 300	-2,03
COV5 04	яичник	1				Потеря функции	6,63	4,17	-2,13
HBCx3	молочная железа	1					> 300	20,8	-2,41
YD38	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	-2,42
TE14	пищевод	1			Возможная потеря функции	Потеря функции	> 300	> 300	-3,41

SNUC 5	толстая кишка	1	Возможна я потеря функции				> 300	92,4	-3,77
RCM1	толстая кишка	1				Потеря функции	> 300	> 300	-4,06
KLE	матка	1					> 300	> 300	-4,23
59M	яичник	1	Возможна я потеря функции			Потеря функции	34,9	63,4	-4,47
BICR1 8	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	-4,48
8305C	щитови дная железа	1					> 300	> 300	-5,09
HBCx1 9	молочн ая железа	1					> 300	> 300	-5,22
KMBC 2	мочево й пузырь	1					> 300	> 300	-5,4
SCC25	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	-5,55
G292C LONE A141B 1	кость	1				Потеря функции	> 300	> 300	-5,91
HS870 T	кость	1					> 300	> 300	-5,91
GSU	желудо к	2					> 300	> 300	-5,99
U251 MG	нервна я систем а	1					> 300	> 300	-6,15

SNU10 41	голова и шея	1	Возможна я потеря функции				> 300	> 300	-6,88
HS739 T	молочная железа	1					> 300	> 300	-7,43
BICR2 2	голова и шея	1				Потеря функции	> 300	> 300	-7,51
OVA2 BUR	яичник	1					> 300	> 300	-8,68
HBCx1 3B	молочная железа	1					> 300	> 300	-8,98
HBCx2	молочная железа	1					> 300	> 300	-10,4
SW948	толстая кишка	2	Возможна я потеря функции			Потеря функции	> 300	> 300	-10,7
HUO9	кость	1					> 300	> 300	-11,1
HS578 T	молочная железа	1					> 300	> 300	-13,8
HS888 T	кость	1					> 300	> 300	-14,5

Таблица 2

Клеточная линия	Орган	Число повторов	Распознавание вручную ATM	Распознавание вручную BRCA1	Распознавание вручную BRCA2	Автоматическое распознавание TP53	IC50 формулы (нМ)	IC50 олапарта (нМ)	Балл по Блису
MDA MB436	молочная железа	12		Потеря функции		Потеря функции	4,5	0,1	-4,27
TE11	пищевод	1					> 316	> 316	-10,5
MER014	плевра						> 316	> 316	-2,15
MER082	плевра						> 316	> 316	-3,95
CW2	толстая кишка	1			Возможная потеря функции		67	> 316	-5,65
UWB 1289B RCA1	яичник	1					113	> 316	9,29
HPAC	поджелудочная железа	1				Потеря функции	> 316	> 316	-6,71
HCC1806	молочная железа	2				Потеря функции	62	97	16,7
NCIH 520	легкое						> 316	> 316	19,5
COV362	яичник		Возможная потеря функции	Возможная потеря функции			203	17	4,96
HCT116	толстая кишка	1			Возможная потеря функции		> 316	> 316	28,8
MSTO 211H	легкое	1					> 316	> 316	18,2
JHOS 2	яичник	1							

MDA MB43 6	молочная железа	12		Потеря функции		Потеря функции	4,5	0,1	-4,27
TE11	пищевод	1					> 316	> 316	-10,5
MER0 14	плевра						> 316	> 316	-2,15
MER0 82	плевра						> 316	> 316	-3,95
CW2	толстая кишка	1			Возможная потеря функции		67	> 316	-5,65
SNU6 68	желудок	1		Возможная потеря функции					
GOTO	нервная система	1							
SNUC 4	толстая кишка	1		Возможная потеря функции					
HCC2 108	легкое	1				Потеря функции			
SUM1 49PT	молочная железа	1		Потеря функции					
LIMT1	молочная железа	1							

На фиг. 1, 2 и 3 показаны репрезентативные результаты анализов колониеобразования с использованием ингибитора USP1 формулы II. На фиг. 1 показан синергический эффект комбинации ингибитора USP1 формулы II и нирапариба. В клеточной линии JHOS2, показанной на фиг. 1, ингибитор USP1 и нирапариб практически не продемонстрировали активности в виде отдельных агентов вплоть до 300 нМ; однако комбинация двух агентов вызвала синергический эффект на рост клеток. Кроме того, комбинация 100 нМ каждого агента оказала больший эффект, чем 300 нМ одного нирапариба. В клеточной линии COV362, показанной на фиг. 2, ингибитор USP1 формулы II и нирапариб продемонстрировали умеренную активность в виде отдельных агентов; но в комбинации ингибитор USP1 и нирапариб имели синергический эффект на рост клеток. Кроме того, комбинация 100 нМ каждого агента продемонстрировала больший эффект, чем 300 нМ одного нирапариба. На фиг. 3 показана синергическая активность, наблюдаемая для UWB1.289, клеточной линии яичника с мутацией BRCA1. Несмотря на то что UWB1.289 была чувствительна как к ингибитору USP1, так и к нирапарибу в виде отдельных агентов, комбинация 30 нМ каждого агента имела эквивалентный эффект на рост, что и 300 нМ одного нирапариба.

Результаты в табл. 1 показали, что синергизм был обнаружен в клеточных линиях, обогащенных в отношении мутаций с потерей функции или возможных мутаций с потерей функции BRCA1, что свидетельствует о том, что пациенты с такими мутациями могут получить пользу от комбинированной терапии ингибитором USP1 и ингибитором PARP. Например, из общего количества клеточных линий с мутацией BRCA1, проанализированных в анализах КОЕ, 8 из 9 клеточных линий продемонстрировали синергизм выше предельного показателя, равного 6. На фиг. 14 показаны репрезентативные результаты анализа колониеобразования с использованием ингибитора USP1 формулы I в клетках рака яичника HCT116. Результаты в табл. 2 показали, что синергизм был обнаружен в клетках рака яичника, молочной железы, легкого и толстой кишки.

Определение значений IC_{50} и оценок синергизма.

Значения IC_{50} рассчитывали путем аппроксимации двухпараметрического уравнения Хилла к изменениям дозозависимого ответа. Нелинейный метод наименьших квадратов использовали для поиска значений параметров, которые минимизируют квадрат ошибки модели, подогнанной под измеренный дозозависимый ответ. Оценку нелинейного метода наименьших квадратов выполняли с помощью пакета `minpack.lm R`, версия 1.2-1. Баллы синергизма по Блисссу рассчитывали с помощью пакета `synergyfinder R`, версия 1.6.1.

Определение статуса мутации.

Мутацию в ATM, BRCA1 и BRCA2 определяли с помощью внутрилабораторного конвейера. Данные РНК-секвенирования CCLE анализировали с помощью инструмента GATK MuTect2, версия 3.7.0-g56f2c1a, чтобы идентифицировать варианты, а затем классифицировали с помощью инструмента GATK Funcotator, версия 3.7.0-g56f2c1a. Funcotator классифицировал распознавание вариантов мутаций как одно из следующего: "молчащая", "миссенс", "сайта сплайсинга", "нонсенс" или "со сдвигом рамки". Автоматическое распознавание мутаций, классифицированных как сайта сплайсинга, нонсенс или со сдвигом рамки, проверяли вручную. Проверка вручную оценивала, была ли мутация гомозиготной, а также можно ли связать распознавание с артефактами секвенирования или распознавания вариантов, например, малой глубиной секвенирования или инделями, расположенными в гомополимерных последовательностях, и обобщала влияние на ген, когда для одного гена распознавали несколько событий. Результатом проверок мутаций вручную была классификация влияния на функции гена как одного из следующего: "потеря функции", "возможная потеря функции" или "дикого типа". Распознавание мутаций для TP53 извлекали из файла CCLE_mutations.csv, загруженного с `depmap.org`.

Пример 2. Выбор PDX-модели.

Пять моделей ксенотрансплантатов, полученных от пациентов, были выбраны на основании доступности и с различными мутационными подписями BRCA и HRD. Активность ингибитора PARP (PARPi) была известна в выбранных моделях на основании более ранних клинических данных и внутренних данных, полученных от XenTech SAS. Исходя из таких более ранних клинических данных, был выбран диапазон восприимчивых и невосприимчивых к PARPi моделей. В табл. 3 приведен обзор моделей, выбранных для проведения тестирования, активности одного агента с соединением формулы I и комбинированной активности с соединением формулы I и олапарибом.

Таблица 3

	Модель опухоли	Мутация BRCA	Оценка HRD (Myriad)*	Чувствительность к формуле I	Комбинированная активность
Восприимчивость к PARP	HBCx-10	2	57	Отсутствует	Отсутствует
	HBCx-14	ДТ	53	Отсутствует	Есть
	T168	1	54	Частичная	Отсутствует
Частичный ответ на PARP	HBCx-11	1	73	Частичная	Есть
	HBCx-23	ДТ	НД	Отсутствует	Отсутствует

Пример 3. Противоопухолевая активность формулы I в форме свободного основания в модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме свободного основания в сравнении с олапарибом и нирапарибом оценивали у мышей, используя подкожную модель опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. Самкам мышей NOD SCID в возрасте 7-9 недель, полученным от Beijing Anikeeper Biotech Co. Ltd, подкожно вводили 10×10^6 опухолевых клеток MDA-MB-436. Когда опухоли достигали объема приблизительно 200 мм^3 , мышей рандомизировали в группы по 10 особей и через желудочный зонд им вводили контроль, нирапариб (50 мг/кг), олапариб (75 мг/кг) или ингибитор USP1 формулы I в дозе 30, 100 или 300 мг/кг один раз в день или 30 мг/кг два раза в день в течение 28 дней. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали с помощью среднего объема опухоли в группе лечения на 28 день - 0 день/средний объем опухоли в группе, получавшей контроль, на 28 день-0 день, где 0 день является первым днем лечения.

Как показано на фиг. 4А, > 90% ингибирования роста опухоли наблюдали при более высоких дозах один раз в день или два раза в день. Как показано на фиг. 4В, дозы до 300 мг/кг хорошо переносились мышами с опухолями.

Пример 4. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в модели BRCA1 мутантной опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в сравнении с олапарибом и нирапарибом оценивали у мышей, используя подкожную модель опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. Самкам мышей NOD SCID в возрасте 7-9 недель, полученным от Beijing Ani-

keeper Biotech Co. Ltd, подкожно вводили 10×10^6 опухолевых клеток MDA-MB-436. Когда опухоли достигали объема приблизительно 200 мм^3 , мышей рандомизировали в группы по 10 особей и через желудочный зонд им один раз в день в течение 28 дней вводили контроль, нирапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или ингибитор USP1 формулы I в дозе 10, 30, 100 или 300 мг/кг. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали с помощью среднего объема опухоли в группе лечения на 28 день - 0 день/средний объем опухоли в группе, получавшей контроль, на 28 день-0 день, где 0 день является первым днем лечения.

Как показано на фиг. 5A, > 90% ингибирования роста опухоли наблюдали при более высоких дозах один раз в день. Дозы до 300 мг/кг формулы I в форме сокристалла хорошо переносились мышами с опухолями, как показано на фиг. 5B.

Пример 5. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в мышинной ксенотрансплантатной модели опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя подкожную модель опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. Самкам мышей NOD SCID в возрасте 7-9 недель, полученным от Beijing Anikeeper Biotech Co. Ltd, подкожно вводили 10×10^6 опухолевых клеток MDA-MB-436. Когда опухоли достигали объема приблизительно 200 мм^3 , мышей рандомизировали в группы по 10 особей для введения контроля, формулы I (100 мг/кг) отдельно и формулы I (30 мг/кг) отдельно; или по 5 особей для введения олапариба (50 мг/кг) отдельно, комбинации формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг) и комбинации формулы I (30 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Мышам вводили соответствующее лечение через желудочный зонд один раз в день в течение 28 дней.

Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали с помощью среднего объема опухоли в группе лечения на 28 день - 0 день/средний объем опухоли в группе, получавшей контроль, на 28 день-0 день, где 0 день является первым днем лечения.

Данные на фиг. 6A и 6B показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба в группах комбинированного лечения наблюдалась повышенная противоопухолевая активность в мышинной подкожной модели MDA-MB-436. В исследовании комбинации олапариба (50 мг/кг) и формулы I (100 мг/кг) переносимость оценивали путем мониторинга массы тела и расчета изменений массы тела в виде % от массы тела в день начала лечения (0 день), как показано на фиг. 6C.

В повторных исследованиях оценивали противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом у мышей, используя подкожную модель опухоли молочной железы человека MDA-MB=436. Самкам мышей NOD SCID в возрасте 7-9 недель, полученным от Beijing Anikeeper Biotech Co. Ltd, подкожно вводили 10×10^6 опухолевых клеток MDA-MB-436. Когда опухоли достигали объема приблизительно 200 мм^3 , мышей рандомизировали в группы по 10 особей и ежедневно (один раз в день) им вводили контроль, формулу I (100 мг/кг) отдельно, формулу I (300 мг/кг) отдельно, олапариб (50 мг/кг) отдельно, олапариб (100 мг/кг) отдельно или комбинацию формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг), комбинацию формулы I (100 мг/кг) и олапариба (100 мг/кг), комбинацию формулы I (300 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг); или по 6 особей и два раза в день им вводили формулу I (100 мг/кг, два раза в день) отдельно, комбинацию формулы I (100 мг/кг, два раза в день) и олапариба (50 мг/кг). Мышам вводили соответствующее лечение через желудочный зонд один раз в день или два раза в день, как указано выше, в течение 28 дней.

Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Процент ингибирования роста опухоли (TGI) рассчитывали с помощью среднего объема опухоли в группе лечения на 27 день - 0 день/средний объем опухоли в группе, получавшей контроль, на 27 день - 0 день, где 0 день является первым днем лечения.

Во всех группах, состоящих из 10 мышей, на 28 день введения дозы 6 мышей из группы умерщвляли для проведения анализа образцов *ex vivo*. За оставшимися 4 мышами в группе наблюдали на предмет ответа после прекращения введения дозы.

Данные на фиг. 6D и 6E показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба в группах комбинированного лечения наблюдалась повышенная противоопухолевая активность в мышинной подкожной модели MDA-MB-436. Кроме того, все группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность по сравнению с самой высокой дозой олапариба (100 мг/кг). Во всех группах комбинированного лечения переносимость оценивали путем мониторинга массы тела и расчета изменений массы тела в виде % от массы тела в день начала лечения (0 день), как показано на фиг. 6F. Все комбинации формулы I и олапариба переносились хорошо, что было неожиданным, поскольку не все комбинированные терапии олапарибом хорошо переносятся. См., например, Samol, J., et al., Invest. New Drugs, 30:1493-500 (2012) ("Further development of

olaparib and topotecan in combination was not explored due to dose-limiting hematological AEs and the resulting sub-therapeutic MTD.").

Пример 6. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в моделях, полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя множество моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы на голых мышах, как показано на фиг. 7A-7E. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-9 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 20 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от 60 до 320 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль, формула I (30 мг/кг), олапариб (50 мг/кг) или комбинация формулы I (30 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение вплоть до 42 дней в зависимости от кинетики роста модели опухоли. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения.

Данные на фиг. 7D показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в полученной от пациента мышинной подкожной модели HBCx-14. Данные на фиг. 7A показывают потенциальные преимущества комбинации в полученной от пациента мышинной подкожной модели HBCx11.

Пример 7. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в PDX-модели молочной железы человека с мутацией BRCA1 и высоким статусом HRD HBCx-11.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали в PDX-модели молочной железы человека с мутацией BRCA1 и высоким статусом HRD HBCx-11, как показано на фиг. 8A-8E. Модель HBCx-11 представляет собой модель с высоким уровнем RAD51, а HRD относится к биомаркеру Myriad HRD (определяется как вредоносные или предполагаемые вредоносные мутации в генах BRCA1 и BRCA2 и/или положительный показатель нестабильности генома (Genomic Instability Score - GIS); GIS представляет собой алгоритмическое измерение потери гетерозиготности (Loss of Heterozygosity -LOH), теломерного аллельного дисбаланса (Telomeric Allelic Imbalance - TAI) и крупномасштабных переходов состояний (Large-scale State Transitions - LST), используя ДНК, выделенную из фиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) образцов опухолевой ткани; см. myriad.com/products-services/precision-medicine/mychoice-cdx/). Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-9 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 20 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от 60 до 200 мм³, мышей рандомизировали в группы по 10 особей и распределяли их в следующие группы: контроль, формула I (300 мг/кг), формула I (100 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение до 49 дней (с 0 дня по 48 день). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения.

Данные на фиг. 8A-8D показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в PDX-модели молочной железы человека с мутацией BRCA1 и высоким статусом HRD HBCx-11. Кроме того, комбинированное лечение продемонстрировало повышенную противоопухолевую активность по сравнению с самой высокой дозой олапариба (100 мг/кг). Данные массы тела на фиг. 8E показывают, что комбинация переносилась хорошо.

Пример 8. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы HBCx-14 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя множество моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы на голых мышах, как показано на фиг. 9A-9D. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-9 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 20 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 60 до 130 мм³, мышей рандомизировали в группы по 10 особей и распределяли их в следующие группы: контроль, олапариб (50 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 42 дней (дни 1-42). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а

полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 9A-9C показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента олапариба группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в полученной от пациента мышью подкожной модели НВСх-14. Данные массы тела на фиг. 9D показывают, что комбинация переносилась хорошо.

Пример 9. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника OV0589 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя три модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника на голых мышах, как показано на фиг. 10A-10H. Самок голых мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель, полученных от Beijing Anikeeper Biotech Co., Ltd, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли диаметром 2-3 мм через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 90 до 200 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль, формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 35 дней (дни 0-34). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 10A-10G показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в мышью подкожной модели полученного от пациента яичника OV0589. Кроме того, комбинированное лечение продемонстрировало такую же эффективность, что и самая высокая доза олапариба (100 мг/кг). Лечение формулой I отдельно также продемонстрировало противоопухолевую активность для обеих доз. Измерения массы тела указывают на то, что все виды лечения переносились хорошо (фиг. 10H).

Пример 10. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника ST416 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя три модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника на голых мышах, как показано на фиг. 11A и 11B. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-8 недель, полученных от The Jackson Laboratory, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 70 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 65 до 130 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль, формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 19 дней (дни 0-18). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 11A показывают отсутствие противоопухолевой активности во всех группах лечения в мышью подкожной модели полученных от пациентов яичников ST416. Измерения массы тела указывают на то, что все виды лечения переносились хорошо (фиг. 11B).

Пример 11. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника CTG-0253 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя три модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника на голых мышах. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-8 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 125 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 130 до 240 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль, формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 20 дней. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Пример 12. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника CTG-0253 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя три модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника на голых мышах. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-8 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 60 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 100 до 180 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3-4 особи и распределяли их в следующие группы: контроль (носитель), формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (100 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 18 дней (дни 0-17). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Переносимость оценивали путем расчета изменений массы тела в виде процента (%) от массы тела в день начала лечения (0 день). Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования. Данные на фиг. 15A-F показывают отсутствие противоопухолевой активности во всех группах лечения в мышинной модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов яичника CTG-0253. Данные массы тела на фиг. 15G показывают, что комбинация переносилась хорошо.

Пример 13. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP нирапарибом в мышинной ксенотрансплантатной модели опухоли молочной железы человека MDA-MB-436.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с нирапарибом оценивали у мышей, используя подкожную модель опухоли молочной железы человека MDA-MB-436. Самкам мышей NOD SCID в возрасте 7-9 недель, полученным от Beijing Anikeeper Biotech Co. Ltd, подкожно вводили 10×10⁶ опухолевых клеток MDA-MB-436. Когда опухоли достигали объема приблизительно 319 мм³, мышей рандомизировали в группы по 5 особей и ежедневно (один раз в день) вводили им контроль, нирапариб (20 мг/кг) отдельно, нирапариб (50 мг/кг) отдельно или комбинацию формулы I (100 мг/кг) и нирапариба (20 мг/кг). Мышам вводили соответствующее лечение через желудочный зонд один раз в день, как указано выше, в течение 28 дней.

Массу тела и объем опухоли измеряли по меньшей мере два раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Данные на фиг. 12A-12C показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента нирапариба в группе комбинированного лечения наблюдалась повышенная противоопухолевая активность в мышинной подкожной модели MDA-MB-436. Кроме того, группа комбинированного лечения продемонстрировала повышенную противоопухолевую активность по сравнению с самой высокой дозой нирапариба (50 мг/кг). В группе комбинированного лечения переносимость оценивали путем мониторинга массы тела и расчета изменений массы тела в виде % от массы тела в день начала лечения (0 день), как показано на фиг. 12D. Измерения массы тела указывают на то, что комбинированное лечение переносилось хорошо (фиг. 12E).

Пример 14. Межлекарственное взаимодействие формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом у самок мышей NOD SCID без опухолей.

Межлекарственное взаимодействие ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей путем оценки системного воздействия в плазме с течением времени. Самок мышей NOD SCID в возрасте 6-8 недель, полученных от Beijing Anikeeper Biotech Co. Ltd, рандомизировали в группы по 4 особи и вводили им через желудочный зонд один раз в день в течение 5 дней формулу I (100 мг/кг) отдельно, олапариб (50 мг/кг) отдельно или комбинацию формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг).

В группах введения олапариба (50 мг/кг) отдельно или в комбинации с формулой I (100 мг/кг) образцы крови собирали у каждой мыши в следующие моменты времени после введения дозы в 1 день и 5 день: до введения дозы, через 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч. В группах введения формулы I (100 мг/кг) отдельно или в комбинации с олапарибом (50 мг/кг) образцы крови собирали у каждой мыши в следующие моменты времени после введения дозы в 1 день и 5 день: до введения дозы, через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч.

Данные на фиг. 13A-13D показывают, что совместное введение формулы I и олапариба не повышает ни воздействие формулы I (13A и 13B), ни воздействие олапариба (13C и 13D). Таким образом, комбинированная активность не обусловлена повышением воздействия формулы I или воздействия олапариба.

Пример 15. Десятидневное поисковое исследование токсичности формулы I в форме сокристалла на крысах линии Спрег-Доули и яванских макаках.

А. Десятидневное поисковое исследование токсичности пероральной дозы формулы I в форме сокристалла на крысах линии Спрег-Доули.

Чтобы оценить токсичность и токсикокинетику формулы I в форме сокристалла, формулу I в форме сокристалла вводили самцам крыс линии Спрег-Доули в течение 10 дней через желудочный зонд. Двадцати пяти самцам крыс (*Rattus norvegicus*) в возрасте 7-8 недель (5 особей/группу), полученным от (Envigo RMS, Inc., Индианаполис, штат Индиана), вводили носитель или исследуемый препарат в течение десяти дней один раз в день (1 р/д) или два раза в день (2 р/д) в виде пероральных доз, как описано в табл. 4. Образцы цельной венозной крови объемом приблизительно 0,5 мл собирали из периферической вены крыс для определения воздействия исследуемого препарата. Образцы собирали в дни 1 и 10: до введения (только на 10 день) и через 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч и 24 ч после введения исследуемого препарата. Всех животных умерщвляли для патологоанатомического исследования приблизительно через 24 ч после введения последней дозы.

Токсикокинетические анализы проводили с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin (версия 8.1 или более поздняя), используя некомпартментный подход на основании пути введения.

Таблица 4

Схема введения в исследовании токсичности формулы I в форме сокристалла на крысах линии Спрег-Доули

Группа	Исследуемый препарат	Общая суточная доза (мг/кг)	Общая суточная доза (мг/кг)	Концентрация (мг/мл)**	Схема введения	Количество животных	Животное № (М)
1	Носитель*	0 (носитель)	-	0	1 р/д	5	1-5
2	Формула I, сокристалл	100	-	10	1 р/д	5	6-10
3	Формула I, сокристалл	300	-	30	1 р/д	5	11-15
4	Формула I, сокристалл	1000	-	100	1 р/д	5	16-20
5	Формула I, сокристалл	300	150	15	2 р/д***	5	21-25

* 0,5% НРМС/0,1% Твин-80.

** Поправочный коэффициент 1,288 требовался для поправки на присутствие гентизиновой кислоты.

*** Дозы вводили с интервалом приблизительно 12 ч.

В. Десятидневное поисковое исследование токсичности формулы I в форме сокристалла на яванских макаках.

Чтобы оценить токсичность и токсикокинетику формулы I в форме сокристалла, формулу I в форме сокристалла вводили ежедневно самцам яванских макаков в течение 10 дней. Пятнадцати самцам яванских макаков (*Macaca fascicularis*) в возрасте 2-3 года (3 особи/группу), полученным от Orient BioResource (Алис, штат Техас), вводили носитель или исследуемый препарат через желудочный зонд в течение десяти дней, как описано в табл. 5. При жизни животных осматривали в отношении клинических признаков токсичности, изменения массы тела и потребления пищи. Серийные образцы крови собирали для проведения анализа концентрации в плазме для оценки системного воздействия исследуемого препарата. Всех животных умерщвляли для патологоанатомического исследования приблизительно через 24 ч после введения последней дозы (через 12 ч после введения последней дозы для группы с введением 1 р/д).

Токсикокинетические анализы проводили с помощью программного обеспечения Phoenix Win-Nonlin (версия 8.1 или более поздняя), используя некомпартментный подход на основании пути введения.

Таблица 5

Схема введения в исследовании токсичности формулы I в форме со кристалла на яванских макаках

Группа	Общая суточная доза (мг/кг)	Общая суточная доза (мг/кг)	Концентрация (мг/мл)	Количество животных	Животное № (М)
1	0 (носитель)*	-	0	3	1-3
2	100	-	20	3	4-6
3	300	-	60	3	7-9
4	1000	-	200	3	10-12
5	300	150 2 р/д***	30	3	12-15

* 0,5% НРМС/0,1%Твин-80.

** Поправочный коэффициент 1,288 требовался для поправки на присутствие гентизиновой кислоты.

*** Дозы вводили с интервалом приблизительно 12 ч.

С. Результаты исследования токсичности формулы I в форме сокристалла на крысах линии Спрег-Доули и яванских макаках.

Сводные данные исследований токсичности и токсикокинетики формулы I в форме сокристалла на крысах линии Спрег-Доули и яванских макаках в сравнении с различными ингибиторами PARP представлены в табл. 6. В сравнении с различными ингибиторами PARP, для которых дозолимитирующая токсичность представляет собой гемопоэтическую токсичность (миелосупрессию и панцитопению), дозолимитирующая токсичность формулы I в форме сокристалла представляет собой желудочно-кишечную токсичность и, таким образом, обладает неперекрывающейся дозолимитирующей токсичностью с ингибиторами PARP. В табл. 6 дополнительно показано, что гемопоэтическая токсичность является дозолимитирующей для всех одобренных ингибиторов PARP. Перерыв, снижение и прекращение введения клинической дозы ингибиторов PARP являются распространенными, поскольку пациенты испытывают нежелательные явления при введении ингибиторов PARP, таким образом, существует необходимость в более переносимом и эффективном комбинированном режиме ингибиторов PARP. Таким образом, существует возможность для комбинированного лечения ингибитором USP1 и ингибитором PARP, что может дополнительно повысить эффективность ингибиторов PARP при сниженной дозе без перекрывающейся токсичности.

Сравнение дозолимитирующих токсичностей формулы I в форме сокристалла и различных ингибиторов PARP

Ингибитор USP1	Сводные данные результатов исследования токсичности
Формула I, сокристалл	<ul style="list-style-type: none"> Желудочно-кишечная токсичность являлась дозолимитирующей как у крыс, так и у яванских макак. Изменения в желудке, которые наблюдались при уровнях воздействия $\geq 6x$ прогнозируемой свободной AUC_{ss} человека (монотерапия) и $\geq 13x$ (комбинация), свидетельствовали о раздражающем действии Гемопозитическая токсичность не являлась заметным признаком у обоих видов У крыс не наблюдали ни анемии, ни панцитопении при любом уровне дозы У яванских макак наблюдали снижение количества эритроцитов и лейкоцитов, хотя эти изменения не считались достаточными, чтобы вызвать смерть
Олапариб (NDA № 206162)	<ul style="list-style-type: none"> Олапариб вызывал заметную гематологическую токсичность как в 7-дневном исследовании на крысах, так и в исследовании максимальной переносимой дозы на собаках
Нирапариб (NDA № 208447)	<ul style="list-style-type: none"> Нирапариб вызывал раннюю смерть вследствие токсичности для костного мозга, наблюдаемой в 90-дневном исследовании на крысах Наблюдались значительные изменения гематологических параметров в 28-дневном исследовании нирапариба на собаках
Рукапариб (NDA № 209115)	<ul style="list-style-type: none"> Уменьшение эритроцитарной массы, которое коррелировало с атрофией в костном мозге, наблюдали при применении рукапариба в 28-дневном исследовании на крысах
Талазопариб (NDA № 211651)	<ul style="list-style-type: none"> Дозолимитирующая токсичность была обусловлена гематологическими результатами 90-дневного исследования на крысах

Пример 16. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы HBCx-8 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя множество моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов, включая модель BRCA1 мутантного, TP53 мутантного, с высоким статусом HRD и с высоким уровнем RAD51 трижды негативного рака молочной железы HBCx-8. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-9 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 20 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 60 до 130 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль (носитель), формула I (100 мг/кг), олапариб (100 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (100 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 42 дней (дни 0-41). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Переносимость оценивали путем расчета изменений массы тела в виде процента (%) от массы тела в день начала лечения (0 день). Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 16A-E показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельного агента формулы I или олапариба группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в мышинной модели ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с BRCA1 мутантным, TP53 мутантным, с высоким статусом HRD и с высоким уровнем RAD51 трижды негативным раком молочной железы, HBCx-8. Данные массы тела на фиг. 16F показывают, что комбинация переносилась хорошо.

Пример 17. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели полученных от пациентов ксенотрансплантатов молочной железы HBCx-17 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя множество моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов, включая модель трижды негативного рака молочной железы HBCx-17. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-9 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 20 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 60 до 200 мм³, мышей рандомизировали в группы по 8-10 особей и распределяли их в следующие группы: контроль (носитель), формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг), комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (100 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 43 дней (дни 0-42). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Переносимость оценивали путем расчета изменений массы тела в виде процента (%) от массы тела в день начала лечения (0 день). Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 17A и 17C-L показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельных агентов формулы I и олапариба обе группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в мышинной модели с полученным от пациента ксенотрансплантатом HBCx-17. Данные массы тела на фиг. 17B показывают, что комбинации переносились хорошо.

Пример 18. Противоопухолевая активность формулы I в форме сокристалла в комбинации с ингибитором PARP олапарибом в модели с полученным от пациента ксенотрансплантатом яичника CTG-0703 на голых мышах.

Противоопухолевую активность ингибитора USP1 формулы I в форме сокристалла в комбинации с олапарибом оценивали у мышей, используя множество моделей полученных от пациентов ксенотрансплантатов, включая модель серозной карциномы яичников CTG-0703. Самок голых мышей Athymic в возрасте 6-8 недель, полученных от Envigo, анестезировали и подкожно размещали им фрагмент опухоли размером 60 мм³ через разрез в боку. Когда опухоли достигали объема в диапазоне от приблизительно 110 до 230 мм³, мышей рандомизировали в группы по 3 особи и распределяли их в следующие группы: контроль (носитель), формула I (100 мг/кг), формула I (300 мг/кг), олапариб (50 мг/кг), олапариб (100 мг/кг), комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (50 мг/кг) или комбинация формулы I (100 мг/кг) и олапариба (100 мг/кг). Соединение вводили через желудочный зонд один раз в день в течение 60 дней (дни 0-59). Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Переносимость оценивали путем расчета изменений массы тела в виде процента (%) от массы тела в день начала лечения (0 день). Объем опухоли рассчитывали как среднее значение и стандартную ошибку среднего для каждой группы лечения. Регрессия опухоли (REG) определялась как опухоль с меньшим объемом в последний день исследования по сравнению с первым днем введения дозы, а полная регрессия (ПР) определялась как отсутствие пальпируемой опухоли в конце исследования.

Данные на фиг. 18A и 18C-18L показывают, что по сравнению с эквивалентными дозами отдельных агентов формулы I и олапариба обе группы комбинированного лечения демонстрировали повышенную противоопухолевую активность в мышинной модели с полученным от пациента ксенотрансплантатом CTG-0703. Данные массы тела на фиг. 18B показывают, что комбинации переносились хорошо.

Исследования комбинированного применения в трех дополнительных моделях с полученными от пациентов ксенотрансплантатами карциномы яичника OV5308, OV5392 и OV0243 проводились аналогично описанным выше примерам. Комбинированной активности не наблюдалось в моделях OV5308, OV5392 и OV0243.

Пример 19. Скрининги на сенсбилизацию к CRISPR.

Для проведения скринингов устойчивости к CRISPR-Cas9 линии клеток рака молочной железы и яичника, которые, как известно, являются чувствительными к ингибированию USP1 и/или ингибиторам PARP1, были сконструированы с возможностью экспрессии Cas9 и впоследствии инфицированы лентивирусом, экспрессирующим направляющие РНК, нацеленные на 1500 генов (20 онРНК на ген), участвующих в ответе на повреждение ДНК и в репарации ДНК. Инфицированные клетки размножали в течение 10 дней и разделяли на группы лечения с различными соединениями: DMSO (отрицательный контроль), 300 нМ формулы I в форме сокристалла, 300 нМ олапариба и комбинация 150 нМ формулы I в форме сокристалла и 150 нМ олапариба. Через 14 дней культивирования в присутствии лекарственного средства клетки собирали, экстрагировали геномную ДНК и с помощью секвенирования Illumina определяли представленность направляющей. Чтобы определить эффект нарушения, содержание каждой онРНК сравнивали с эталонным образцом, используя плазмидную библиотеку и момент времени непосредственно перед началом обработки соединением в качестве эталонов. Для каждой направляющей в библиотеке подсчитывали количество прочтений, связанных с этой направляющей, и рассчитывали log-

кратное изменение ($\log FC$), определенное как: $\log FC = \log((\text{подсчет образца} + 1) / (\text{эталонный подсчет} + 1))$. Чтобы обеспечить сопоставимость величины эффекта среди экспериментальных условий, показатели, связанные с каждой направляющей, стандартизировали путем вычитания среднего $\log FC$ для каждого образца из каждой направляющей и деления на среднее абсолютное отклонение, получая Z -показатель для каждой направляющей. Чтобы агрегировать показатели на уровне направляющих в показатели на уровне генов, рассчитывали "оценку отсева" для каждого гена, являющегося мишенью для библиотеки, взяв средний Z -показатель всех направляющих, которые нацелены на этот ген. Дифференциальные зависимости, где индуцированная CRISPR потеря функции гена улучшала приспособляемость клеток в присутствии лекарственного средства по сравнению с лечением DMSO, использовали для идентификации механизма лекарственной устойчивости. Для каждого гена использовали точный критерий Фишера, чтобы определить связь между медикаментозным лечением и количеством выделенных клонов, при этом ложные открытия контролировали с помощью корректировки p -значения Бенджамини-Хохберга. Для оценки качества скрининга включали неразрезающие направляющие нейтрального контроля, а также направляющие положительного контроля, которые нацелены на тысячи положений в геноме и надежно вызывают гибель клеток. Контрольные направляющие вели себя, как ожидалось при скринингах линии клеток рака молочной железы MDA-MB-436, демонстрируя разделение между направляющими положительного и нейтрального контроля во всех образцах, при этом большинство направляющих не оказывало никакого эффекта на приспособляемость (фиг. 19). Важно отметить, что нокаут генов ранее описанных медиаторов устойчивости, таких как RAD18 и UBE2A, находился среди основных обогащенных генов после лечения формулой I в форме сокристалла в MDA-MB-436 (фиг. 20). В дополнение к этим известным механизмам устойчивости появился ряд новых генов в качестве медиаторов устойчивости формулы I в форме сокристалла, которые отличаются от совпадений устойчивости после лечения ингибитором PARP1 олапарибом. Аналогично, те же гены, чей нокаут сам по себе вызвал устойчивость к формуле I в форме сокристалла, не вызывали устойчивости в комбинации с олапарибом, что указывает на неперекрывающиеся профили устойчивости.

После полного описания данного изобретения специалистам в данной области техники будет понятно, что то же самое может быть выполнено в широком и эквивалентном диапазоне условий, составов и других параметров, не влияя на объем изобретения или любых вариантов его осуществления.

Другие аспекты реализации изобретения станут очевидны для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания изобретения и при практической реализации описанного в настоящем документе изобретения. Подразумевается, что описание изобретения и примеры являются исключительно иллюстративными, а фактические объем и сущность изобретения определены нижеприведенной формулой изобретения.

Все патенты и публикации, цитируемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Перечень последовательностей

Sequence+listing-RUS_P-506-1469EA_as+filed.TXT
 115 120 125

Gln Lys Asp Lys Gly Asn Cys Lys Glu Asp Ser Leu Ala Ser Tyr Glu
 130 135 140

Leu Ile Cys Ser Leu Gln Ser Leu Ile Ile Ser Val Glu Gln Leu Gln
 145 150 155 160

Ala Ser Phe Leu Leu Asn Pro Glu Lys Tyr Thr Asp Glu Leu Ala Thr
 165 170 175

Gln Pro Arg Arg Leu Leu Asn Thr Leu Arg Glu Leu Asn Pro Met Tyr
 180 185 190

Glu Gly Tyr Leu Gln His Asp Ala Gln Glu Val Leu Gln Cys Ile Leu
 195 200 205

Gly Asn Ile Gln Glu Thr Cys Gln Leu Leu Lys Lys Glu Glu Val Lys
 210 215 220

Asn Val Ala Glu Leu Pro Thr Lys Val Glu Glu Ile Pro His Pro Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Met Asn Gly Ile Asn Ser Ile Glu Met Asp Ser Met Arg His
 245 250 255

Ser Glu Asp Phe Lys Glu Lys Leu Pro Lys Gly Asn Gly Lys Arg Lys
 260 265 270

Ser Asp Thr Glu Phe Gly Asn Met Lys Lys Lys Val Lys Leu Ser Lys
 275 280 285

Glu His Gln Ser Leu Glu Glu Asn Gln Arg Gln Thr Arg Ser Lys Arg
 290 295 300

Lys Ala Thr Ser Asp Thr Leu Glu Ser Pro Pro Lys Ile Ile Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Ile Ser Glu Asn Glu Ser Pro Arg Pro Ser Gln Lys Lys Ser Arg
 325 330 335

Val Lys Ile Asn Trp Leu Lys Ser Ala Thr Lys Gln Pro Ser Ile Leu
 340 345 350

Ser Lys Phe Cys Ser Leu Gly Lys Ile Thr Thr Asn Gln Gly Val Lys
 355 360 365

Gly Gln Ser Lys Glu Asn Glu Cys Asp Pro Glu Glu Asp Leu Gly Lys
 370 375 380

Cys Glu Ser Asp Asn Thr Thr Asn Gly Cys Gly Leu Glu Ser Pro Gly

<110> KSQ THERAPEUTICS, INC.
WYLIE, ANDREW ALISTAIR
SHENKER, SOLOMON MARTIN
SULLIVAN, PAMELA JEAN
STEGMEIER, FRANK
CADZOW, ANNE LOUISE
LIU, HANLAN
SINKEVICIUS, KERSTIN WOLF

<120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНГИБИТОРЫ УБИКВИТИН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ПРОТЕАЗЫ 1 (USP1) И ИНГИБИТОРЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ (PARP)

<130> 4195.012PC03

<150> US 63/146 937
<151> 08.02.2021

<150> US 63/032 245
<151> 29.05.2020

<150> US 62/976 864
<151> 14.02.2020

<160> 1

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1
<211> 785
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> БЕЛОК USP1 ЧЕЛОВЕКА

<400> 1

Met Pro Gly Val Ile Pro Ser Glu Ser Asn Gly Leu Ser Arg Gly Ser
1 5 10 15

Pro Ser Lys Lys Asn Arg Leu Ser Leu Lys Phe Phe Gln Lys Lys Glu
20 25 30

Thr Lys Arg Ala Leu Asp Phe Thr Asp Ser Gln Glu Asn Glu Glu Lys
35 40 45

Ala Ser Glu Tyr Arg Ala Ser Glu Ile Asp Gln Val Val Pro Ala Ala
50 55 60

Gln Ser Ser Pro Ile Asn Cys Glu Lys Arg Glu Asn Leu Leu Pro Phe
65 70 75 80

Val Gly Leu Asn Asn Leu Gly Asn Thr Cys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu
85 90 95

Gln Val Leu Tyr Phe Cys Pro Gly Phe Lys Ser Gly Val Lys His Leu
100 105 110

Phe Asn Ile Ile Ser Arg Lys Lys Glu Ala Leu Lys Asp Glu Ala Asn

sequence+listing-RUS_P-506-1469EA_as+filed.TXT
 660 665 670

Lys Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Leu Tyr Asn Lys Ala Ser Asn Pro Asp
 675 680 685

Lys Val Ala Ser Thr Ala Phe Ala Glu Asn Arg Asn Ser Glu Thr Ser
 690 695 700

Asp Thr Thr Gly Thr His Glu Ser Asp Arg Asn Lys Glu Ser Ser Asp
 705 710 715 720

Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ser Gly Phe Glu Asn Lys Ile Ser Tyr Val
 725 730 735

Val Gln Ser Leu Lys Glu Tyr Glu Gly Lys Trp Leu Leu Phe Asp Asp
 740 745 750

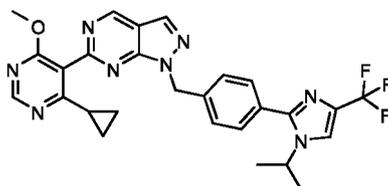
Ser Glu Val Lys Val Thr Glu Glu Lys Asp Phe Leu Asn Ser Leu Ser
 755 760 765

Pro Ser Thr Ser Pro Thr Ser Thr Pro Tyr Leu Leu Phe Tyr Lys Lys
 770 775 780

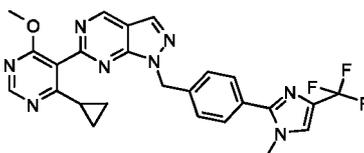
Leu
 785

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

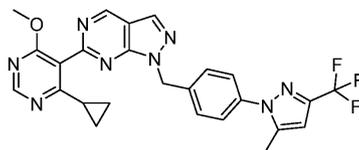
1. Способ лечения рака у субъекта, ранее получавшего лечение первым ингибитором поли АДФ-рибоза полимеразы (PARP), причем способ включает введение субъекту ингибитора убиквитин-специфической протеазы 1 (USP1) и второго ингибитора PARP, при этом первый и второй ингибиторы PARP являются одинаковыми или разными ингибиторами PARP, при этом субъект представляет собой человека, причем ингибитор USP1 представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из формулы I



формулы II



формулы III



и их фармацевтически приемлемых солей, гидратов или сольватов.

2. Способ по п.1, в котором ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP переносятся хорошо.

3. Способ по п.1 или 2, в котором ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP ингибируют рецидив и/или повторный рост ракового заболевания.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP вводятся последовательно.

5. Способ по любому из пп.1-3, в котором ингибитор USP1 и второй ингибитор PARP вводятся одновременно.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором рак выбран из группы, состоящей из гемобластоза, лимфатического рака, рака головного мозга, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака

толстой кишки, рака мочевого пузыря, остеосаркомы или рака яичника, рака кожи, рака матки, рака брюшины и рака эндометрия, рака молочной железы.

7. Способ по п.6, в котором рак яичника представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак p53.

8. Способ по п.6, в котором рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором рак представляет собой мутантный рак BRCA1, мутантный рак BRCA2 или мутантный рак BRCA1 и BRCA2.

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором рак представляет собой устойчивый или рефрактерный к ингибитору PARP рак.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака, лишённого пути репарации повреждений ДНК; рака, дефицитного по гомологичной рекомбинации; рака, содержащего раковые клетки с мутацией в гене, кодирующем p53; рака и рака, содержащего клетки с мутацией в гене, кодирующем ATM.

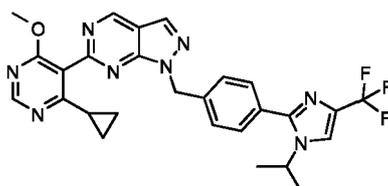
12. Способ по любому из пп.1-10, в котором рак представляет собой рак, содержащий раковые клетки с мутацией с потерей функции в гене, кодирующем p53.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором первый ингибитор PARP представлял собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рукапариб.

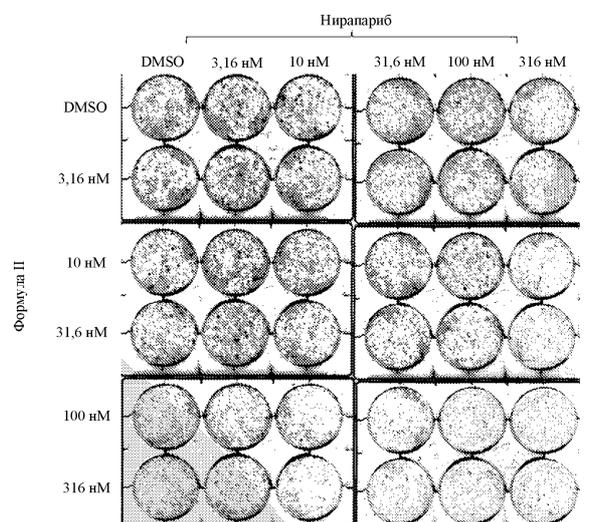
14. Способ по любому из пп.1-13, в котором второй ингибитор PARP представляет собой олапариб, нирапариб, талазопариб или рукапариб.

15. Способ по любому из пп.1-13, в котором второй ингибитор PARP представляет собой олапариб или нирапариб.

16. Способ по любому из пп.1-14, в котором ингибитор USP1 представляет собой соединение формулы I

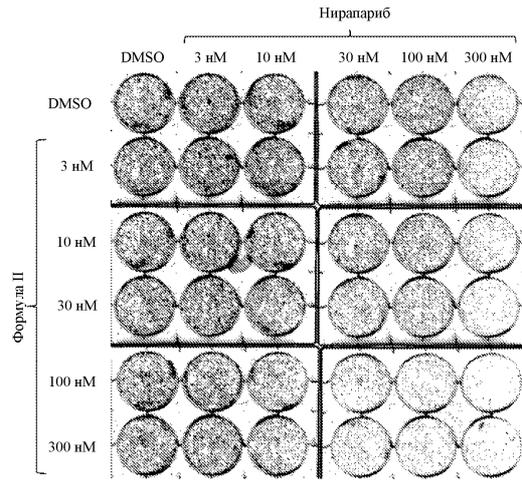


или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат или сольват, и второй ингибитор PARP представляет собой олапариб.



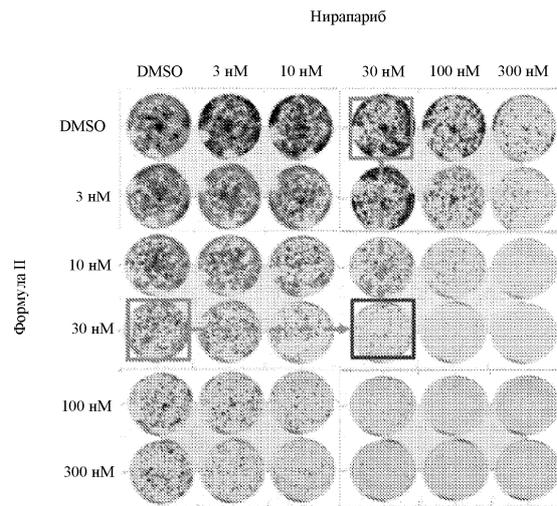
		Нирапариб					
		DMSO	3,16 нМ	10 нМ	31,6 нМ	100 нМ	316 нМ
Формула II	DMSO	100	131	111	114	99	62
	3,16 нМ	115	123	115	107	94	56
	10 нМ	106	128	94	94	77	50
	31,6 нМ	96	126	79	87	69	30
	100 нМ	89	85	66	41	26	21
	316 нМ	74	75	46	34	26	19

Фиг. 1



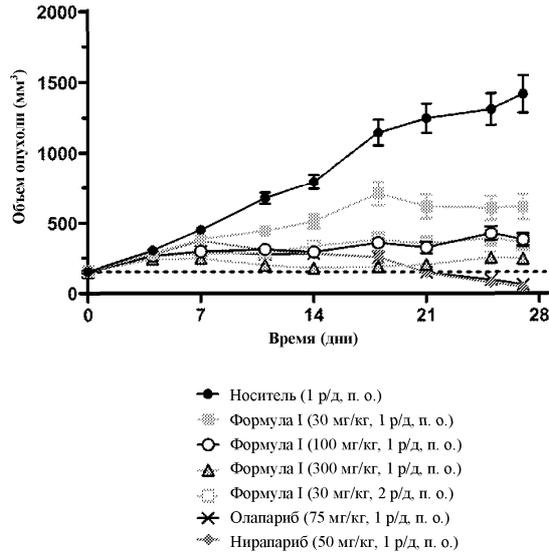
		Нирапариб					
		DMSO	3 нМ	10 нМ	30 нМ	100 нМ	300 нМ
Формула II	DMSO	100	93	85	74	49	18
	3 нМ	83	94	75	72	50	14
	10 нМ	88	87	76	57	34	13
	30 нМ	75	73	60	32	17	9
	100 нМ	69	53	34	19	11	8
	300 нМ	52	42	24	15	9	7

Фиг. 2

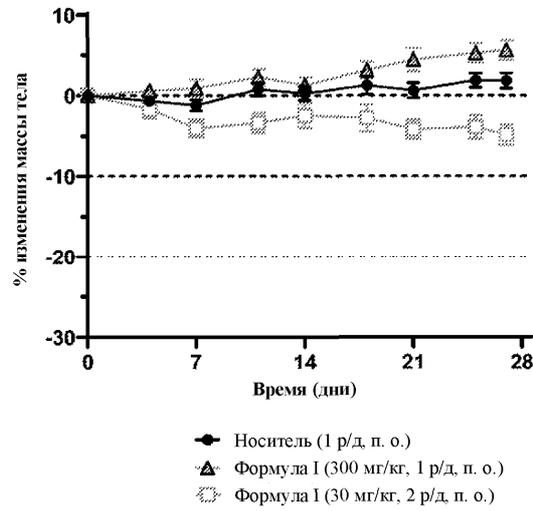


		Нирапариб конц (нМ)					
		0	3	10	30	100	300
Формула II (нМ)	0	100	97	64	61	35	11
	3	89	82	65	56	28	7
	10	65	59	36	26	9	4
	30	46	32	12	6	3	2
	100	14	10	6	3	2	2
	300	15	7	6	3	2	2

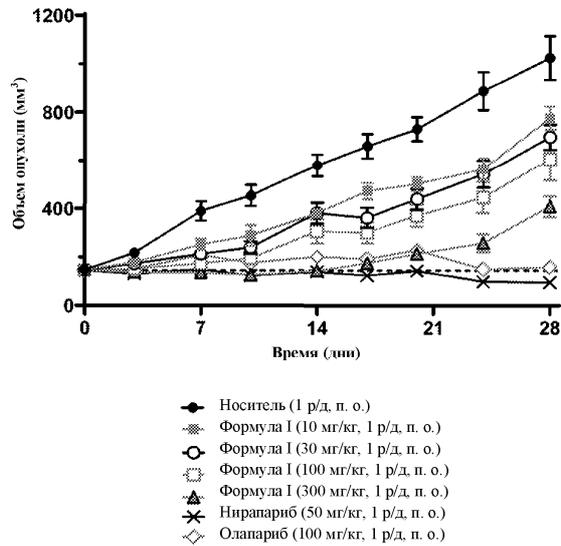
Фиг. 3



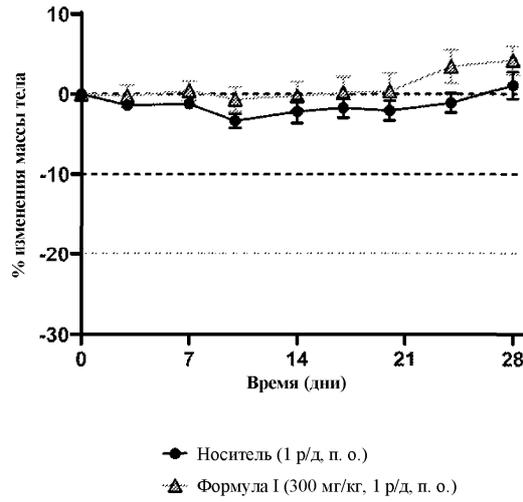
Фиг. 4А



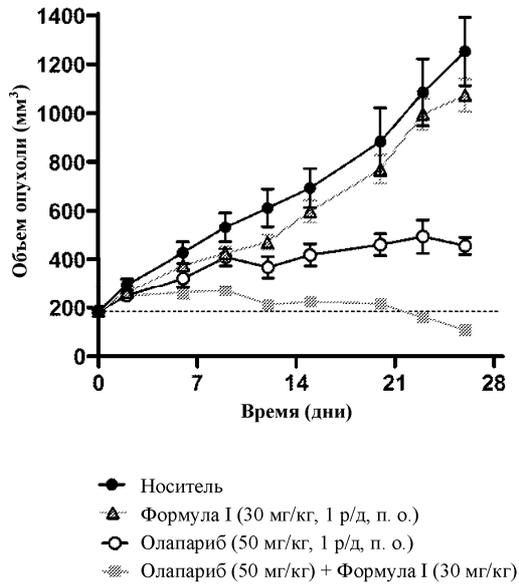
Фиг. 4В



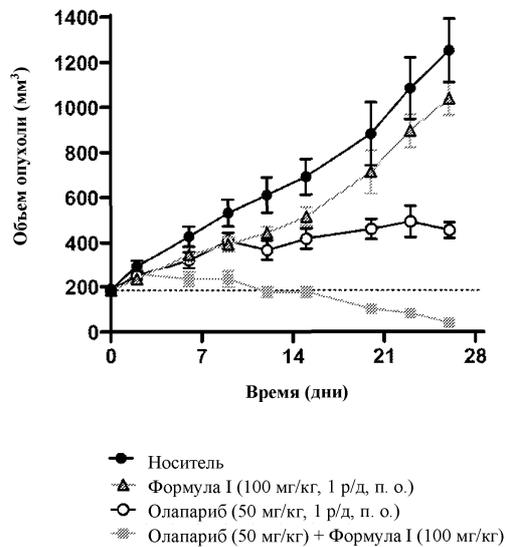
Фиг. 5А



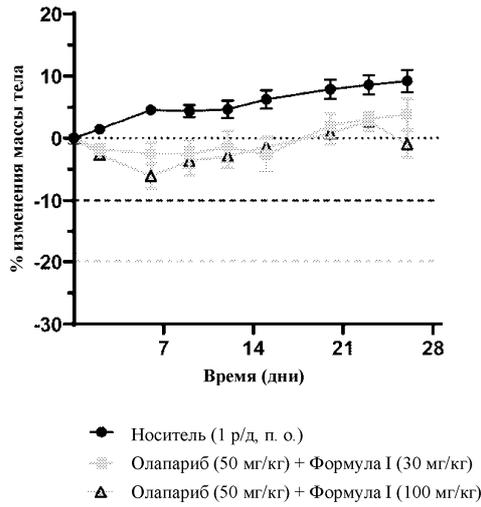
Фиг. 5В



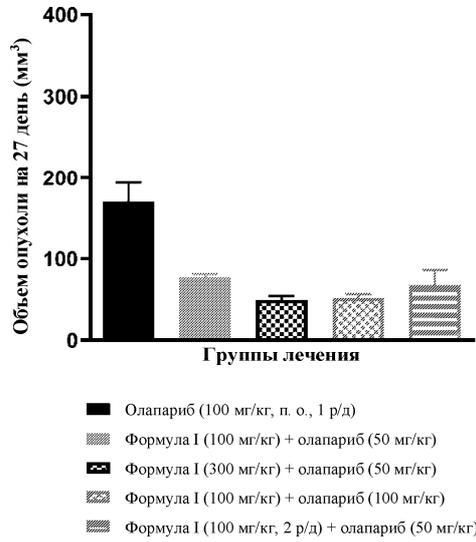
Фиг. 6А



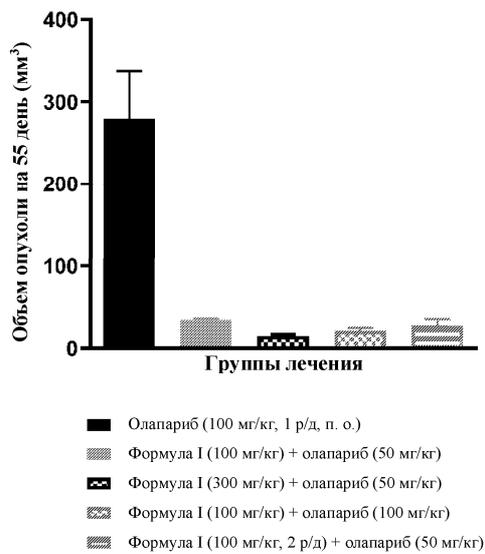
Фиг. 6В



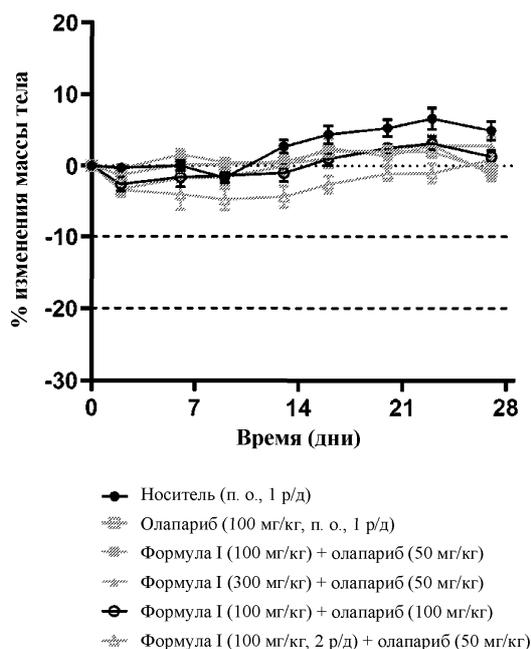
Фиг. 6С



Фиг. 6D



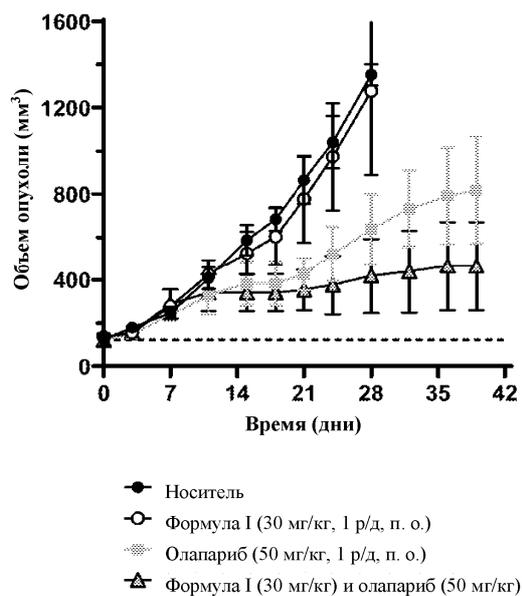
Фиг. 6E



Фиг. 6F

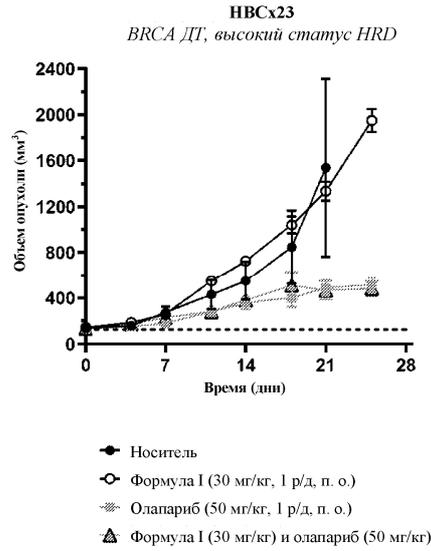
НВСx11

Мутация BRCA1, высокий статус HRD

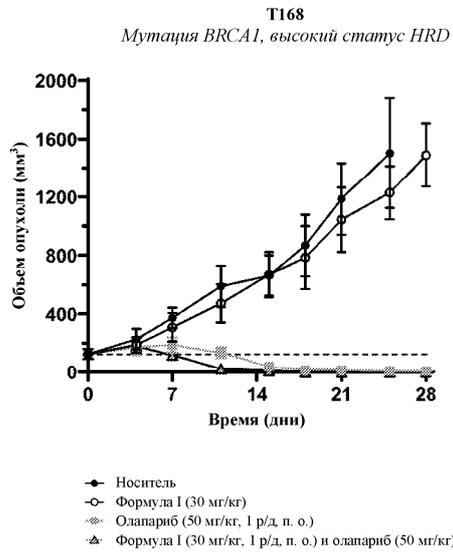


Фиг. 7A

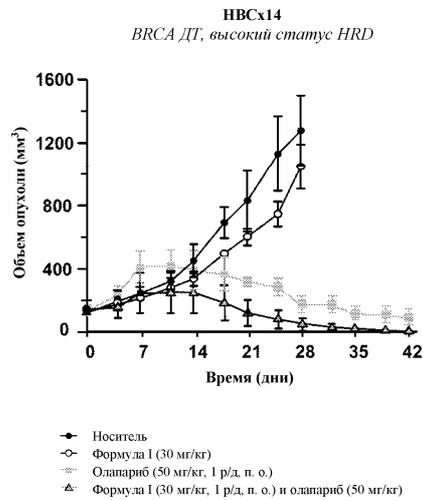
048213



Фиг. 7В

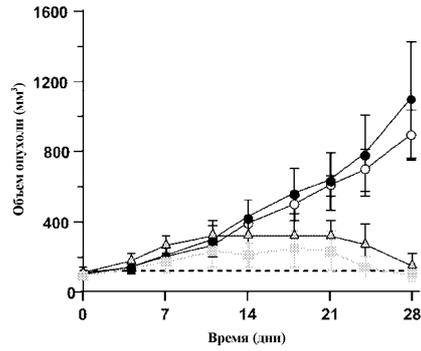


Фиг. 7С



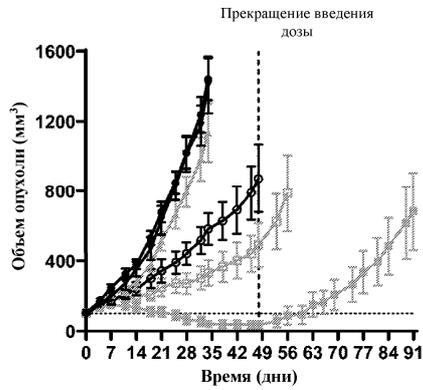
Фиг. 7D

НВСx-10
Мутация *BRCA2*, высокий статус *HRD*



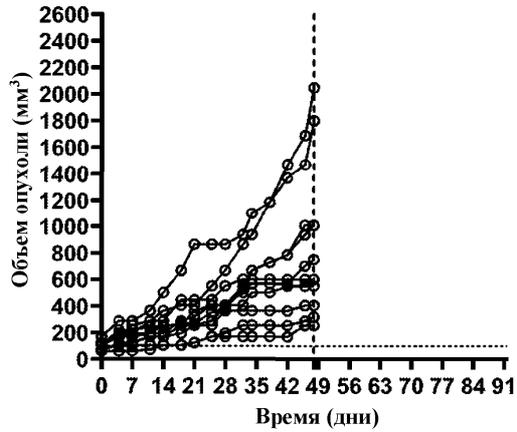
- Носитель
- Формула I (30 мг/кг, 1 р/д, п. о.)
- △ Олапариб (50 мг/кг, 1 р/д, п. о.)
- △ Формула I (30 мг/кг) и олапариб (50 мг/кг)

Фиг. 7Е

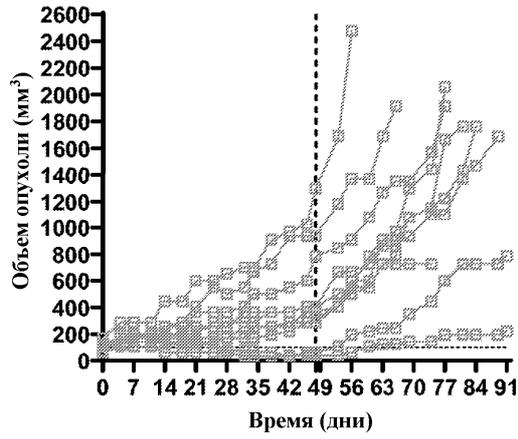


- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Формула I (300 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

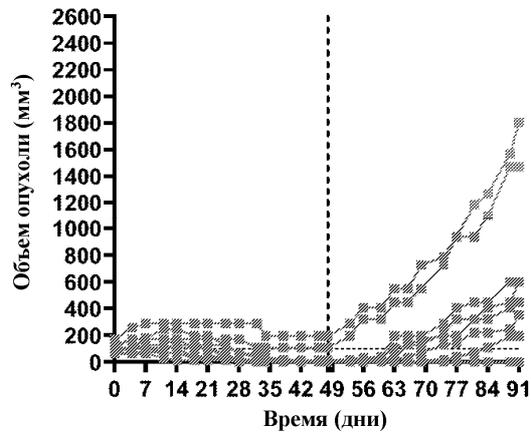
Фиг. 8А



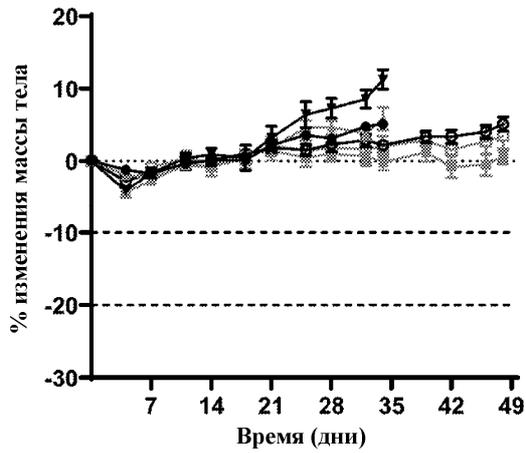
Фиг. 8В



Фиг. 8С

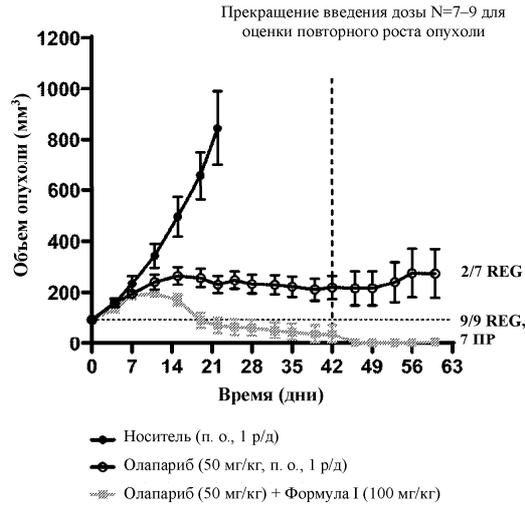


Фиг. 8D

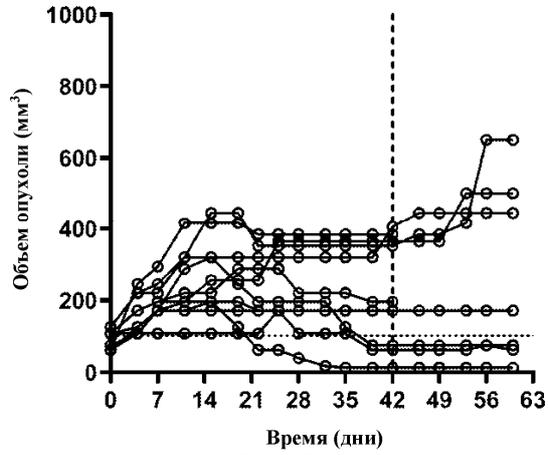


- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▲ Формула I (300 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ⊖ Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ⊗ Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

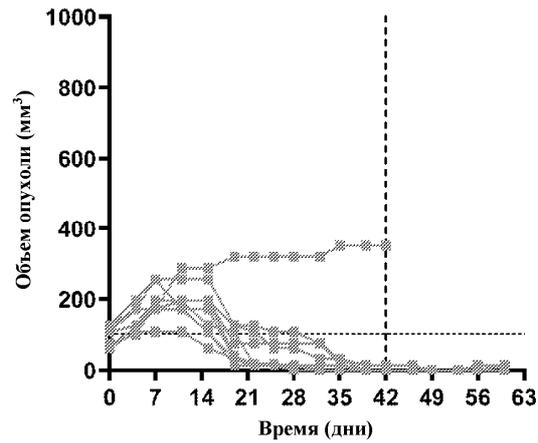
Фиг. 8Е



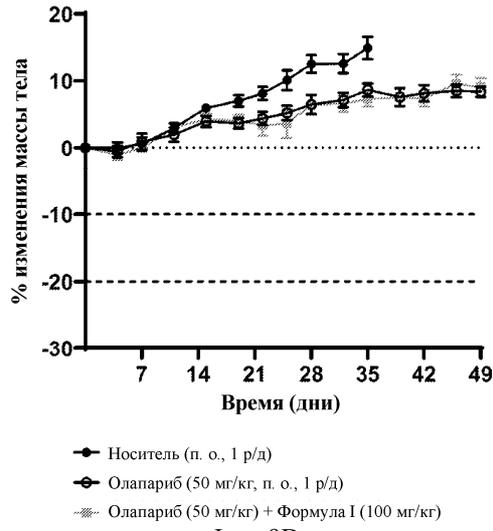
Фиг. 9А



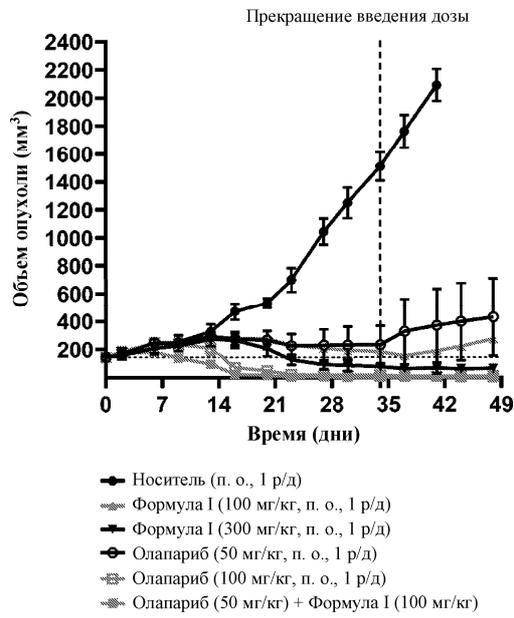
Фиг. 9В



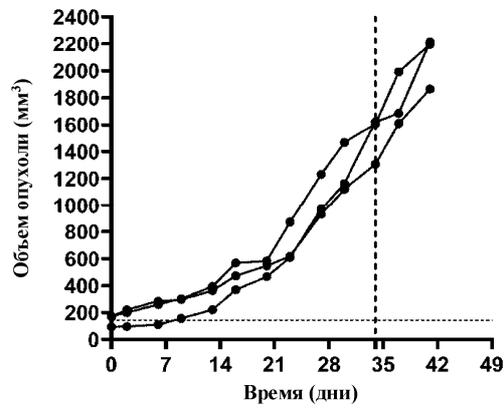
Фиг. 9С



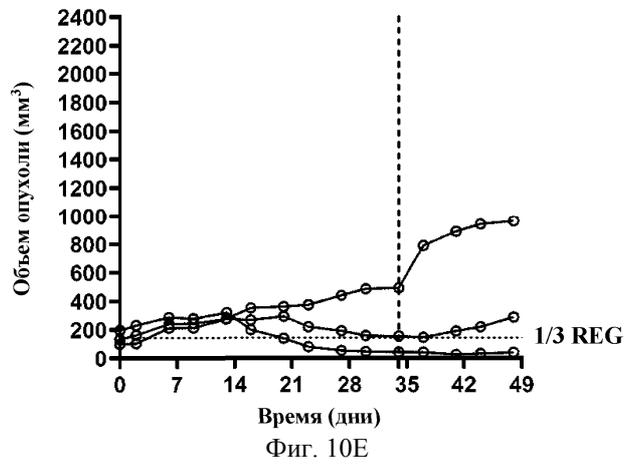
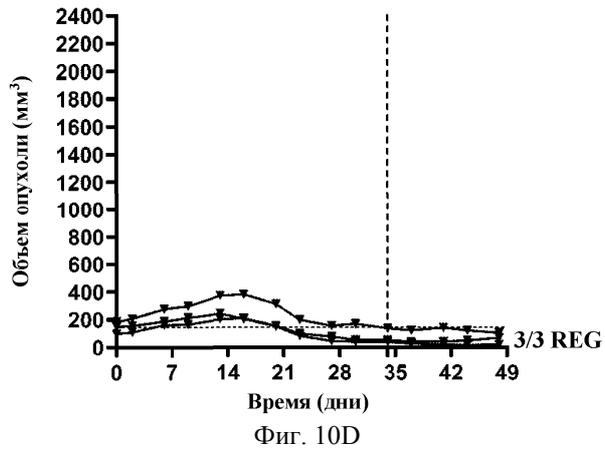
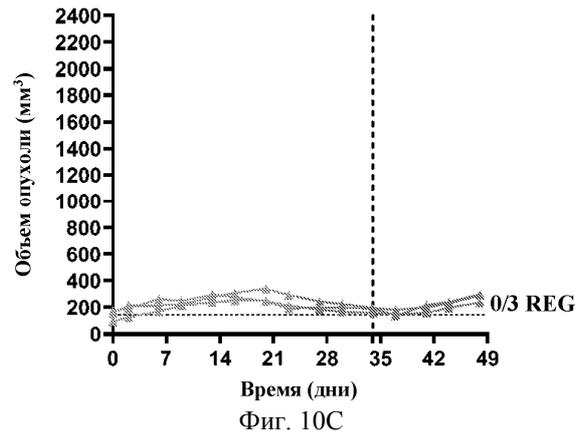
Фиг. 9D

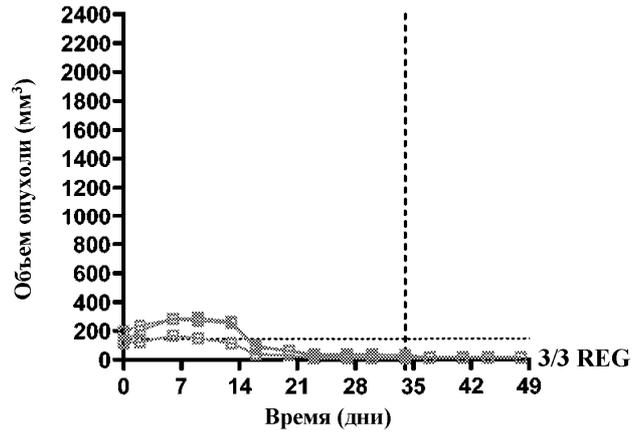


Фиг. 10А

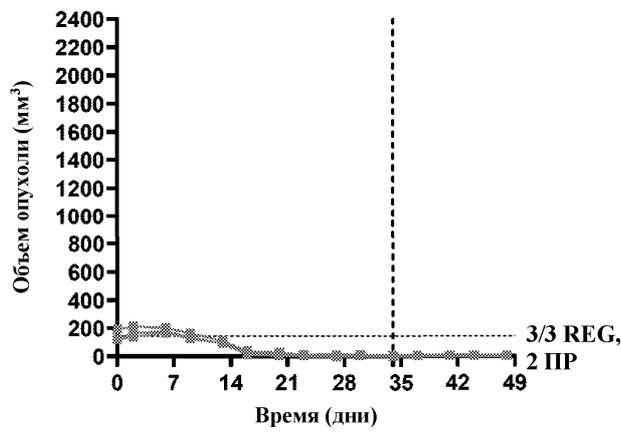


Фиг. 10В

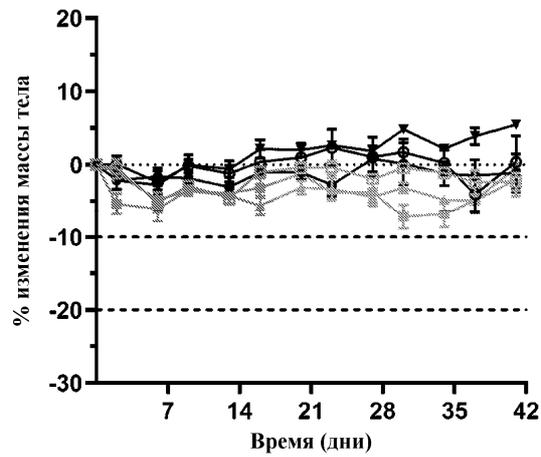




Фиг. 10F

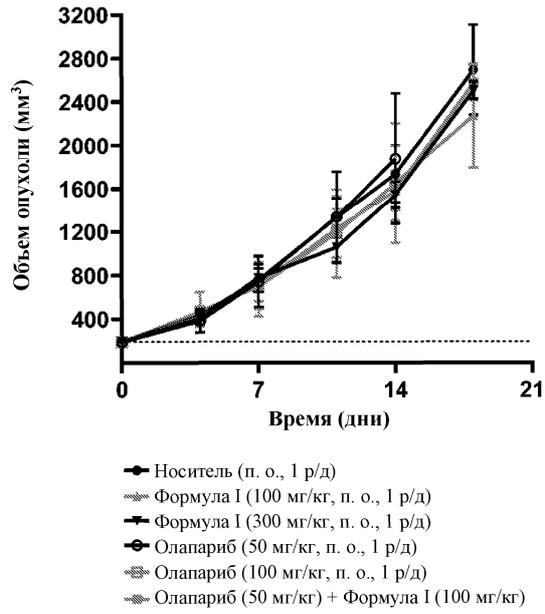


Фиг. 10G

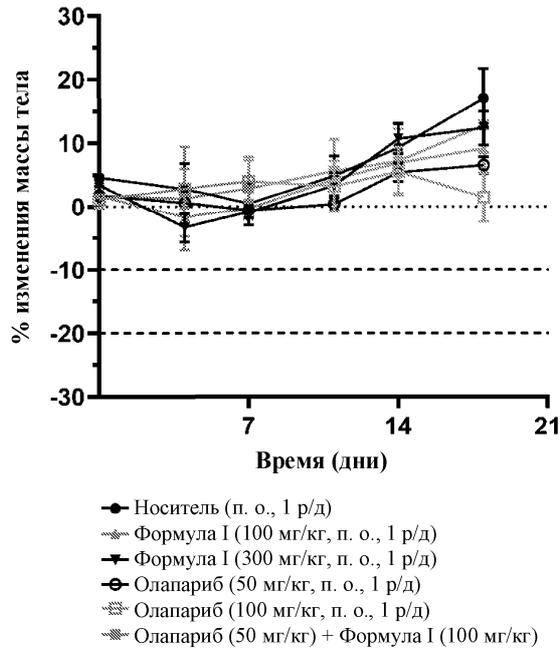


- ◆ Носитель (п. о., 1 р/д)
- ▬ Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▲ Формула I (300 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▨ Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▩ Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

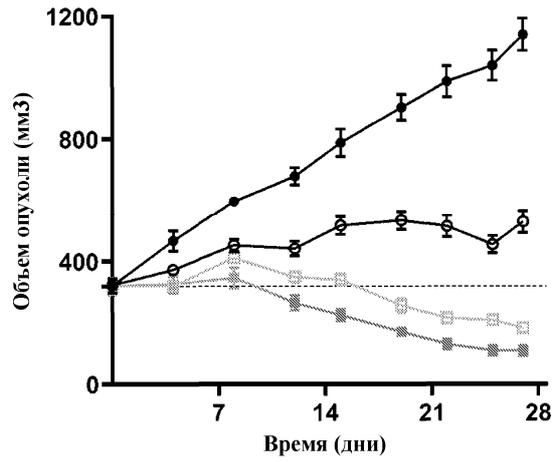
Фиг. 10H



Фиг. 11А

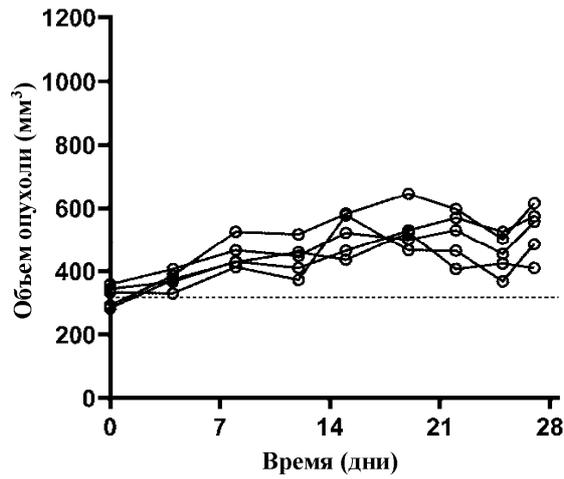


Фиг. 11В

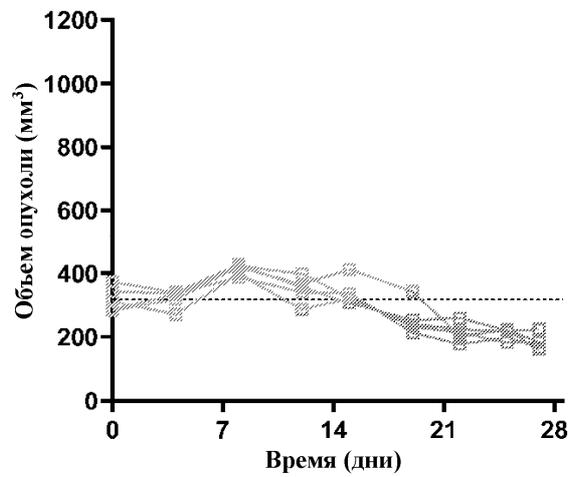


- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Нирапариб (20 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Нирапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Нирапариб (20 мг/кг) + Формула 1 (100 мг/кг)

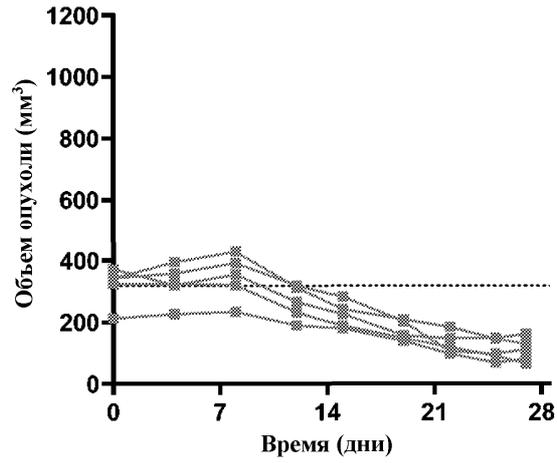
Фиг. 12А



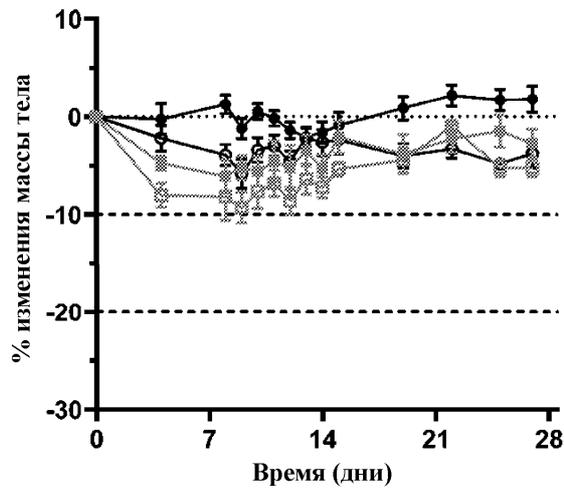
Фиг. 12В



Фиг. 12С

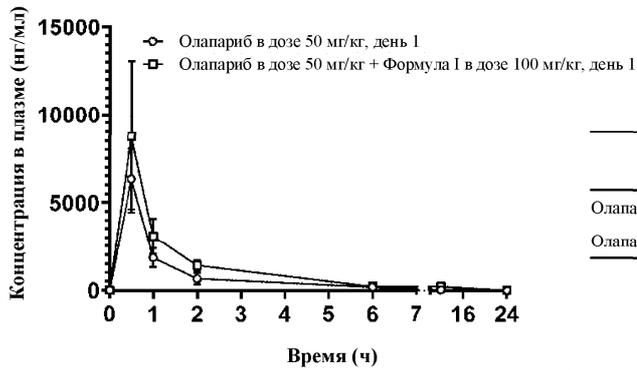


Фиг. 12D



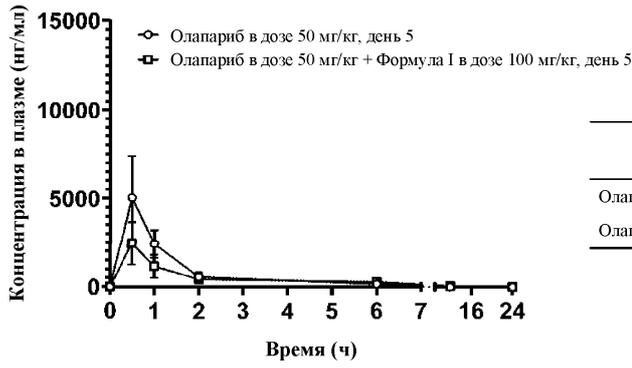
- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Нирапариб (20 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▨ Нирапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ▧ Нирапариб (20 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

Фиг. 12E

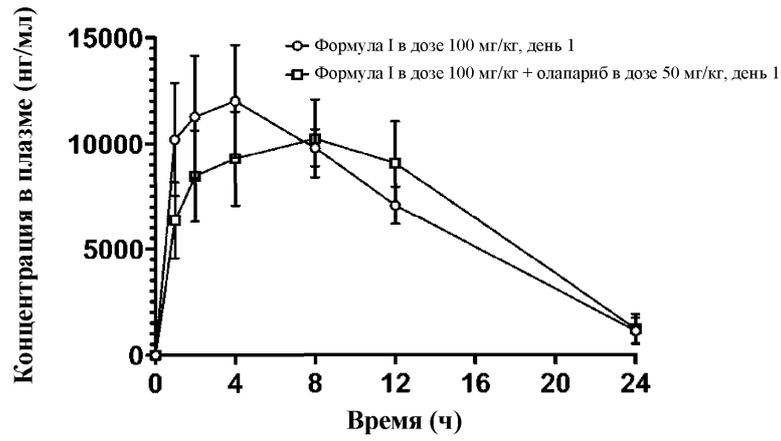


	AUC ₀₋₂₄ (нг·ч/мл)	C _{max} (нг/мл)
Олапариб	7578 ± 920	6348 ± 1724
Олапариб + Формула I	12654 ± 2072	8748 ± 4306

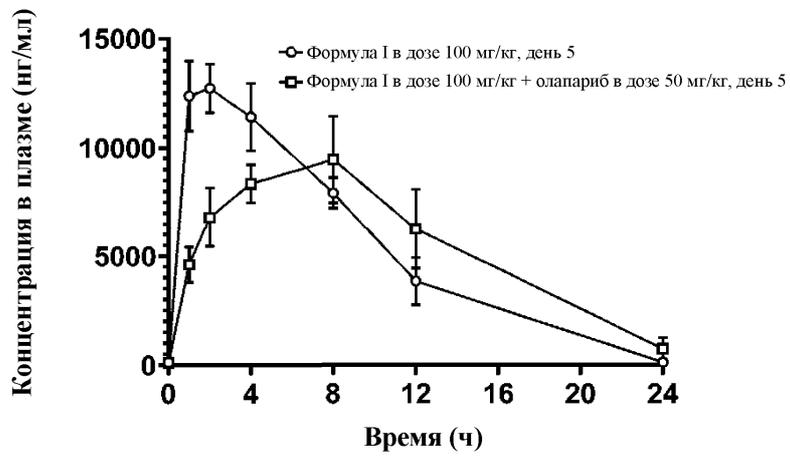
Фиг. 13A



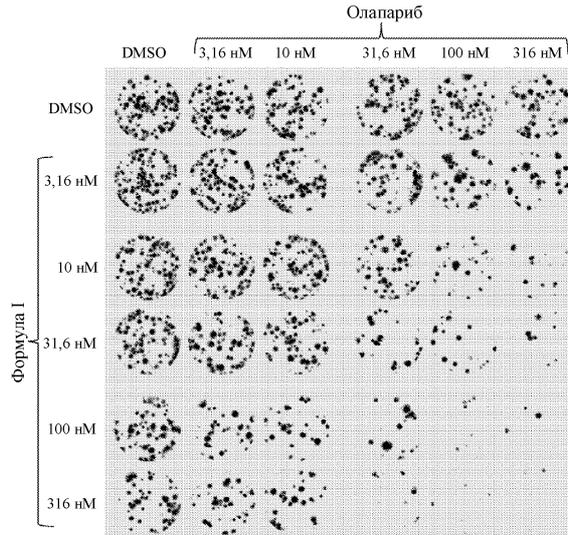
Фиг. 13В



Фиг. 13С

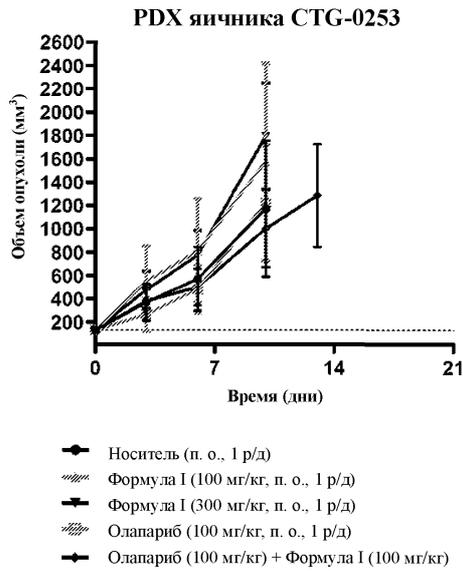


Фиг. 13D

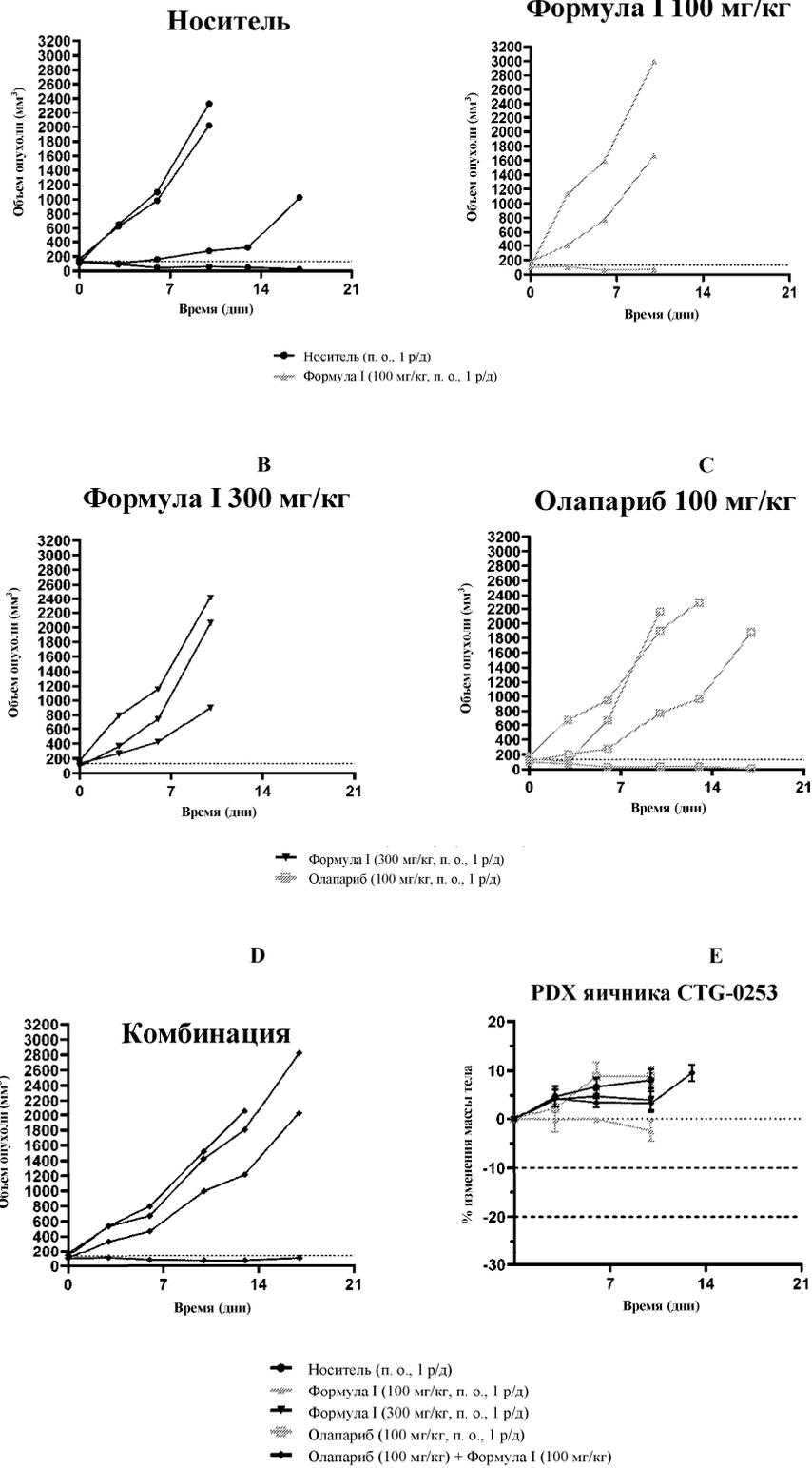


		Олапариб					
		DMSO	3,16 нМ	10 нМ	31,6 нМ	100 нМ	316 нМ
Формула I	DMSO	100	93	86	97	91	80
	3,16 нМ	97	97	92	97	78	63
	10 нМ	102	97	94	83	40	22
	31,6 нМ	93	94	78	52	39	19
	100 нМ	87	61	50	15	2	2
	316 нМ	75	57	56	4	1	0

Фиг. 14

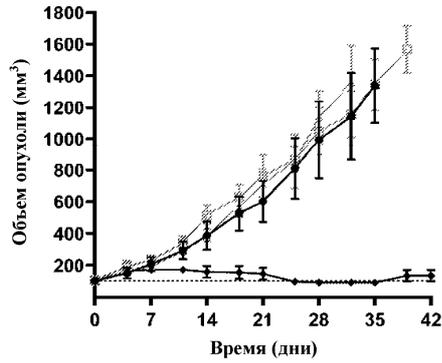


А



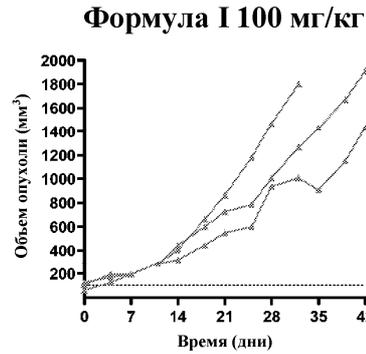
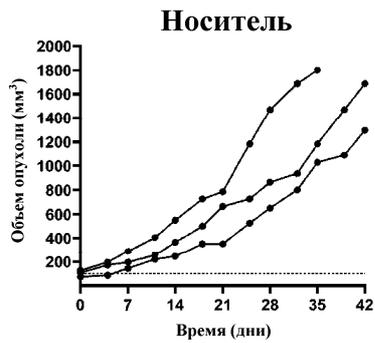
Фиг. 15А-Г

PDX TNBC HBCx-8
с мутацией *BRCA1* и *TP53*



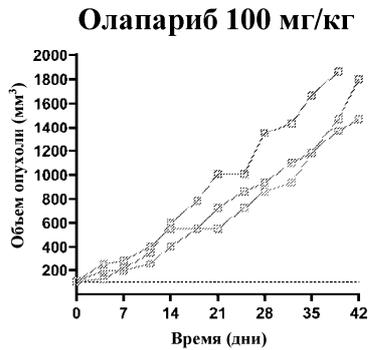
- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ◆ Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

A

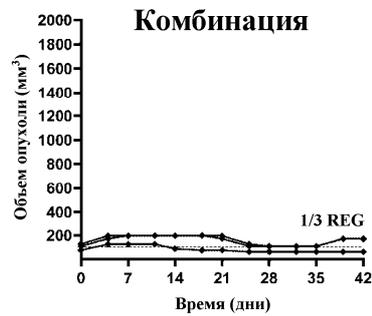


- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)

B



C

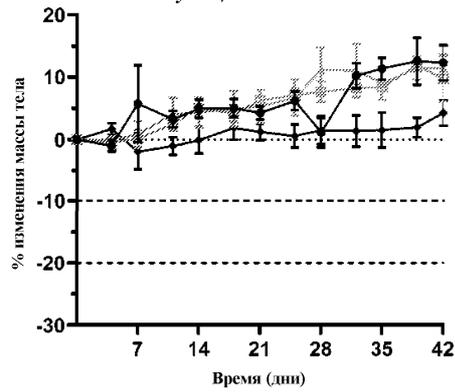


- Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ◆ Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

D

E

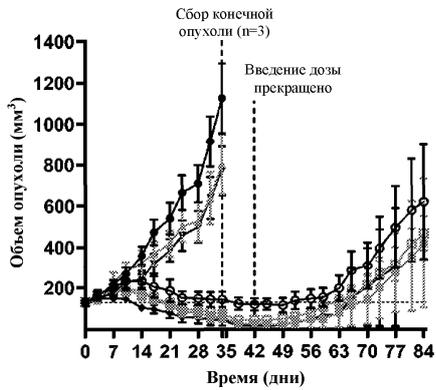
PDX TNBC HBCx-8
с мутацией *BRCA1* и *TP53*



- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ... Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ◆ Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

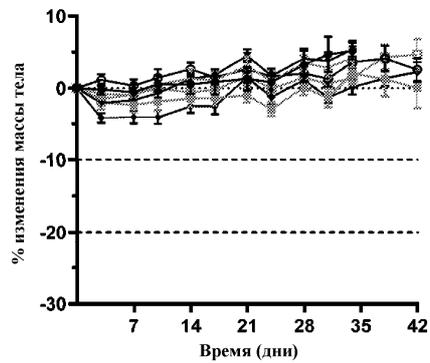
Ф
Фиг. 16А-Ф

PDX TNBC HBCx-17
с мутацией *BRCA2* и *TP53*, высоким статусом *HRD*



- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Формула I (300 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ... Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ... Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)
- ... Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

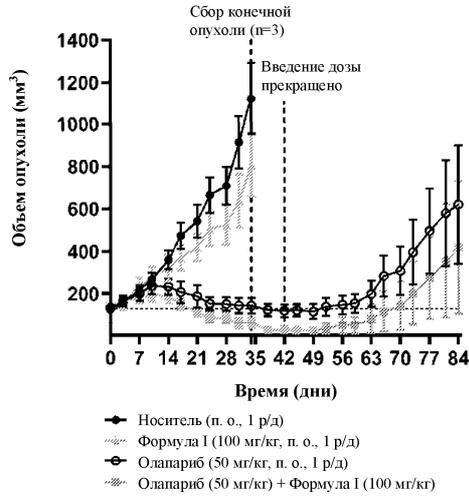
А



- Носитель (п. о., 1 р/д)
- Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Формула I (300 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ... Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- ... Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)
- ... Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

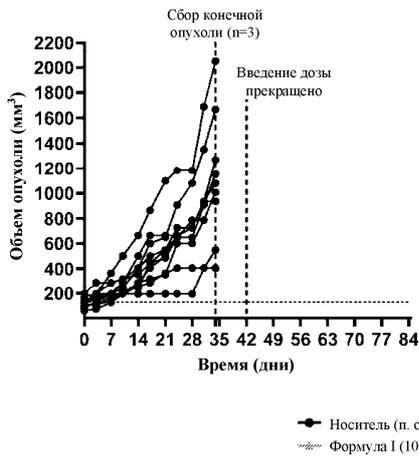
В

PDX TNBC HBCx-17
с мутацией BRCA2 и TP53, высоким статусом HRD

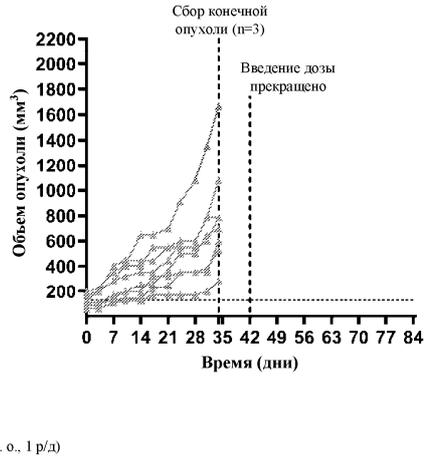


C

Носитель

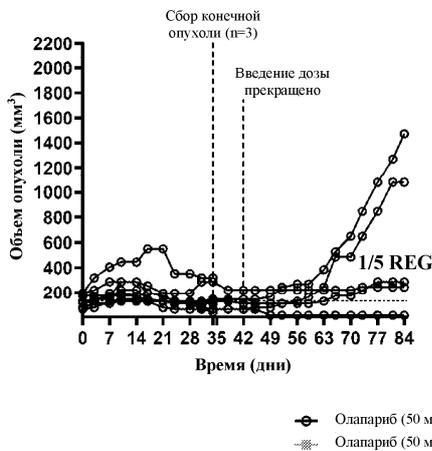


Формула I 100 мг/кг



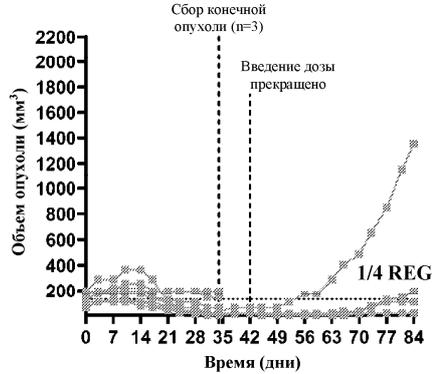
D

Олапариб 50 мг/кг



E

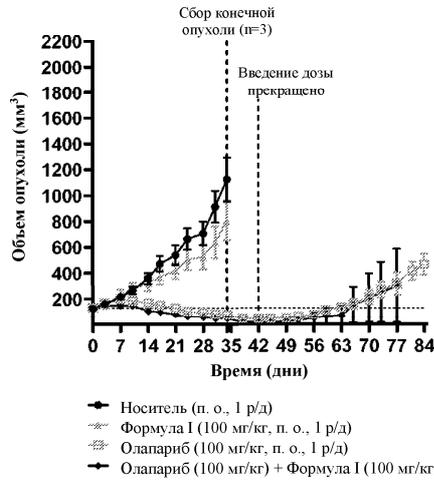
Комбинация



F

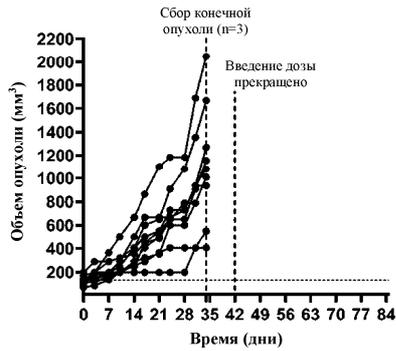
G

PDX TNBC HBCx-17
с мутацией BRCA2 и TP53, высоким статусом HRD

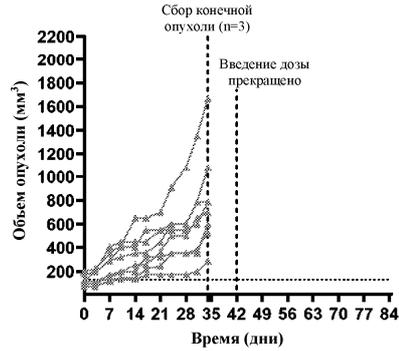


H

Носитель

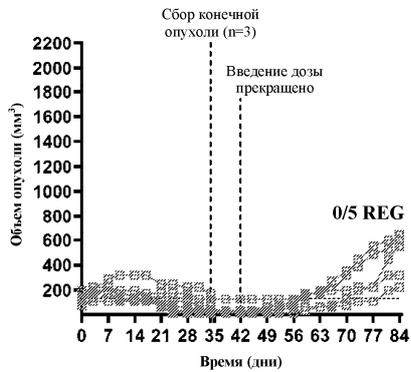


Формула I 100 мг/кг



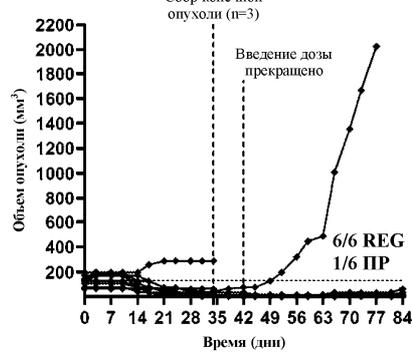
I

Олапариб 100 мг/кг



J

Комбинация

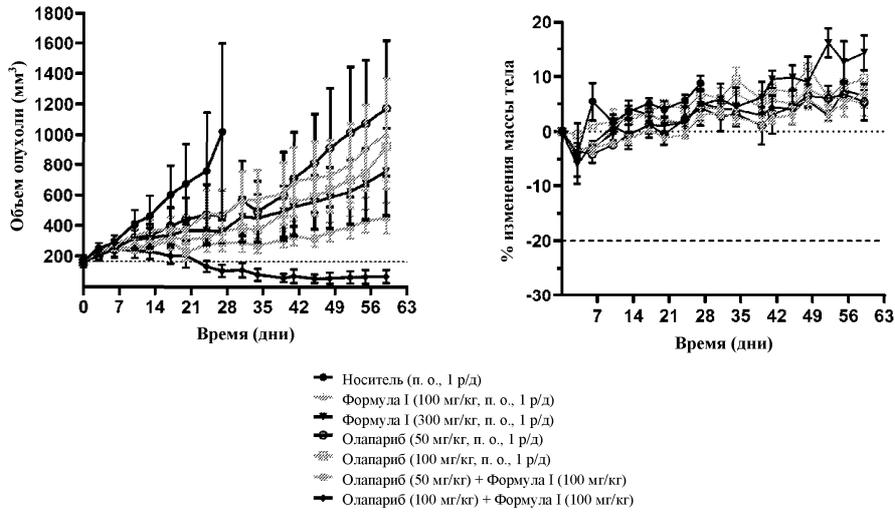


K

Фиг. 17A-L

L

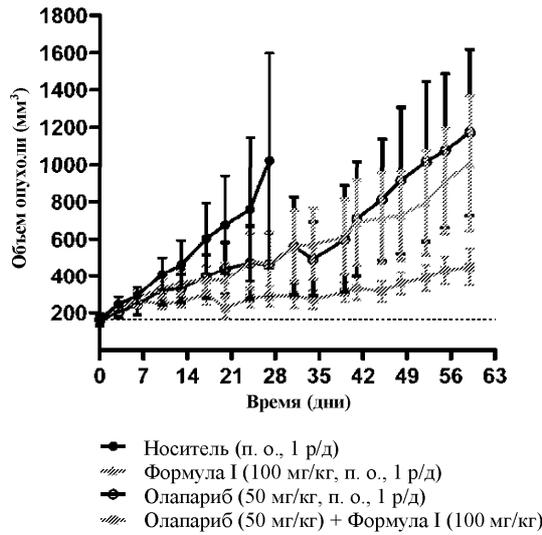
PDX яичника CTG-0703
с мутацией *BRCA1* и *TP53*



A

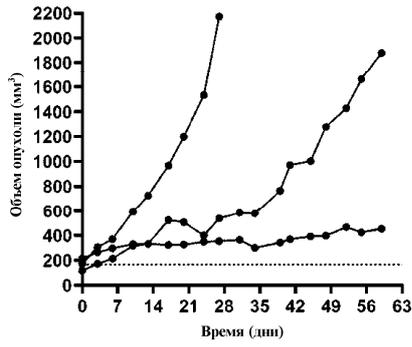
B

PDX яичника CTG-0703
с мутацией *BRCA1* и *TP53*

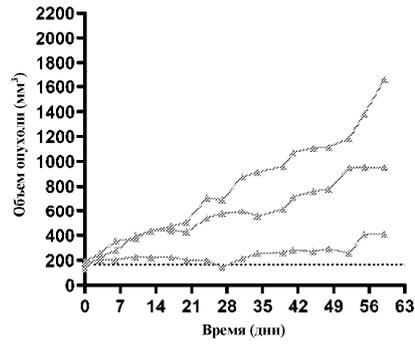


C

Носитель

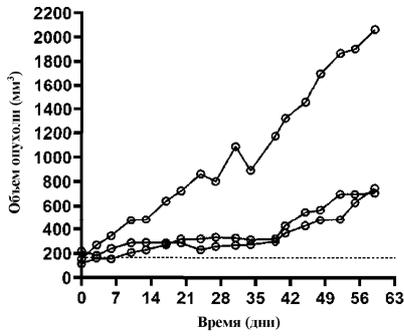


Формула I 100 мг/кг



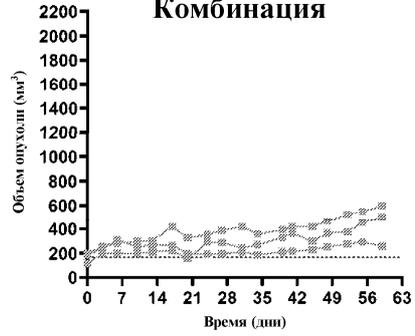
—●— Носитель (п. о., 1 р/д)
- - -○- - - Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)

**Д
Олапариб 50 мг/кг**



Е

Комбинация

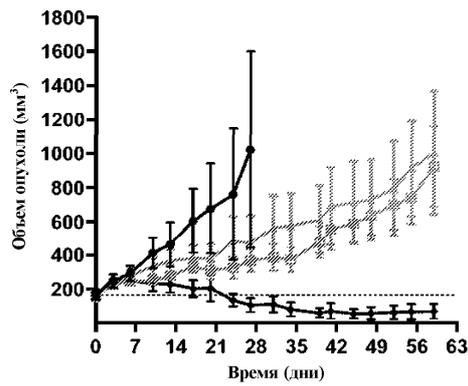


—○— Олапариб (50 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- - -○- - - Олапариб (50 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

Ф

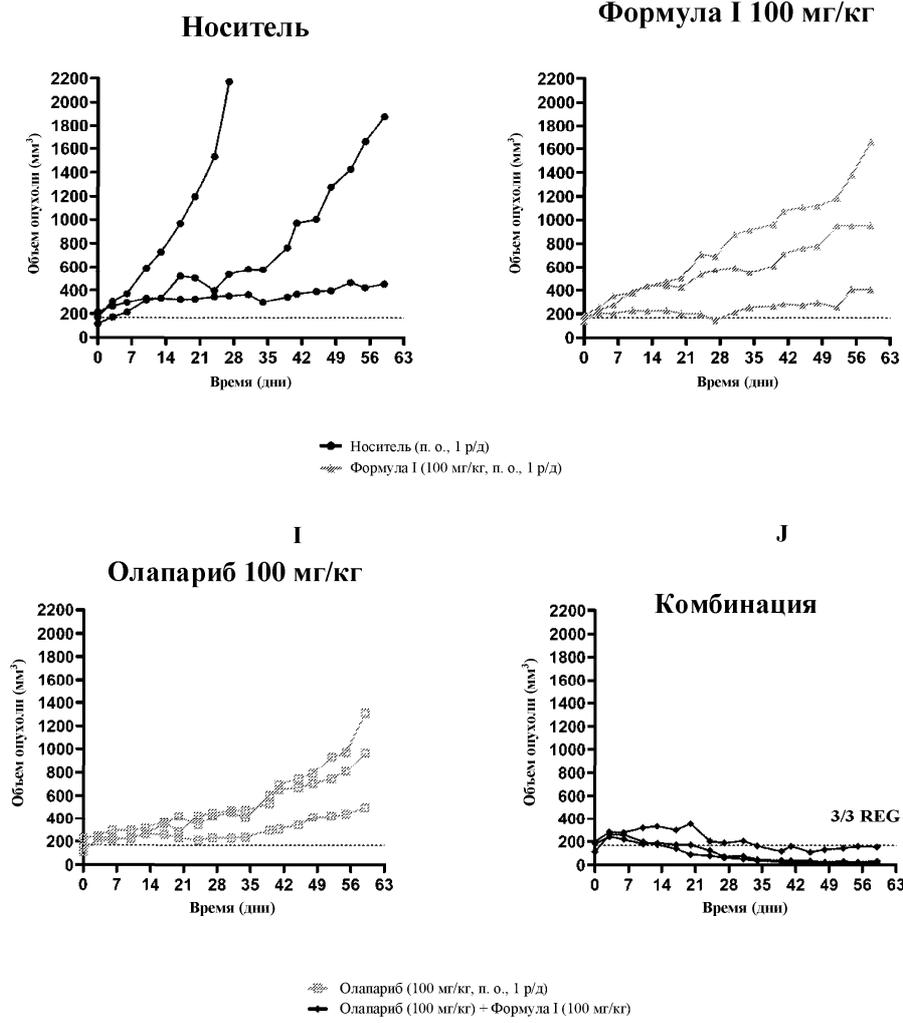
**РДХ яичника СТG-0703
с мутацией BRCA1 и TP53**

Г

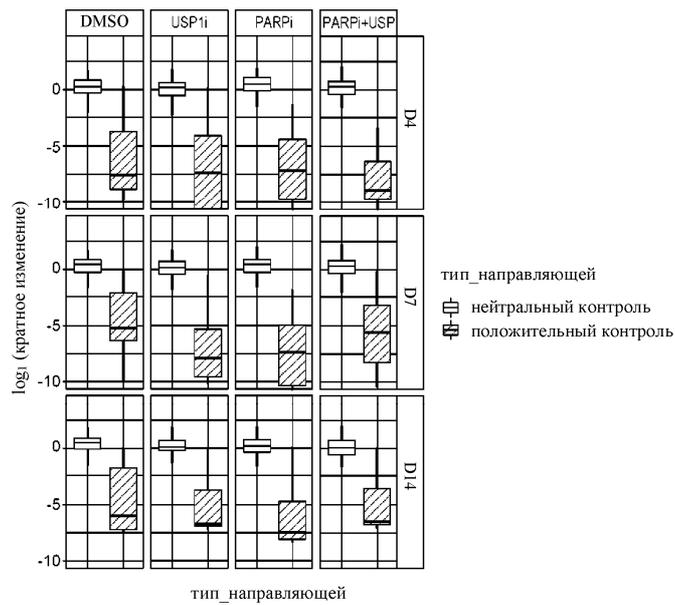


—●— Носитель (п. о., 1 р/д)
- - -○- - - Формула I (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
- - -○- - - Олапариб (100 мг/кг, п. о., 1 р/д)
—●— Олапариб (100 мг/кг) + Формула I (100 мг/кг)

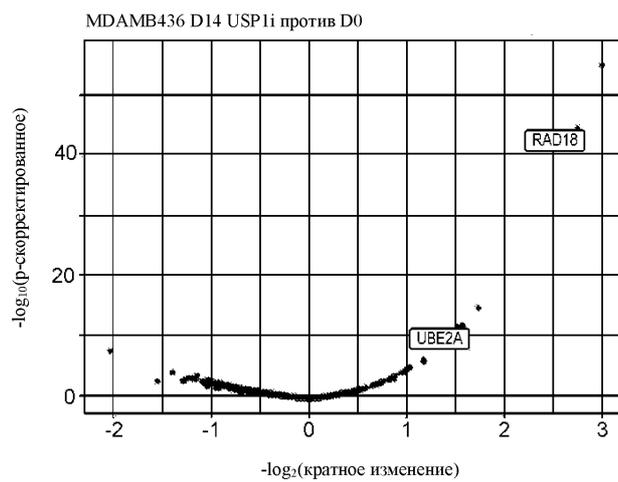
Н



Фиг. 18A-L



Фиг. 19



Фиг. 20