

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11)

**028630**

(13)

**B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации  
и выдачи патента: **2017.12.29**

**(21)** Номер заявки: **201491603**

**(22)** Дата подачи: **2013.03.27**

**(51)** Int. Cl. **A61K 31/403** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

**(54) СПОСОБ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ВЫЗВАННОГО КАНЦЕРОГЕНОМ РАКА С  
ПРИМЕНЕНИЕМ КУРАКСИНА-137**

**(31)** **61/616,216**

**(32)** **2012.03.27**

**(33)** **US**

**(43)** **2015.07.30**

**(86)** **PCT/US2013/034144**

**(87)** **WO 2013/148864 2013.10.03**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИНКУРОН ЭлЭлСи (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Гудков Андрей, Гурова Катерина (US)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Котов И.О., Буре Н.Н. (RU)**

**(56)** GASPARIAN Alexander V. et al. Curaxins: Anticancer Compounds That Simultaneously Suppress NF-kB and Activate p53 by Targeting FACT. *Science Translational Medicine*, 2011, Vol. 3, Issue 95, с 95-106, фиг. 1, 2, 3, 7, 8 (и их описание)

GAMBERINI M. et al. Contribution of hydrazines-derived alkyl radicals to cytotoxicity and transformation induced in normal c-myc-overexpressing mouse fibroblasts. *Carcinogenesis*, 1998 Jan; 19(1):pp. 147-155 (реферат) [он-лайн] [найдено 18.12.2015]. Найдено из PubMed. PMID:9472706

WO-A2-2009143290

GASPARIAN ALEXANDER V. ET AL.: "Curaxins: Anticancer Compounds that Simultaneously Suppress NF-kappa B and Activate p53 by Targeting FACT", *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE*, vol. 3, no. 95, August 2011 (2011-08), pages 95-106, XP008163677, ISSN: 1946-6234 abstract figures 1, 2, page 99, column 1, paragraph 1, figure 4F, page 100, column 2, paragraph 1, figure 5E, page 103, column 2, paragraph 1, page 105, column 1, paragraph 1, page 106, column

2, paragraph 1, figures 52, 55

WO-A1-2010042445

WO-A2-2010009171

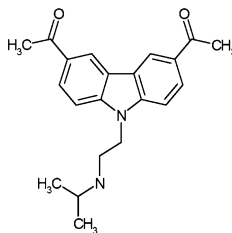
GARCIA HENRY ET AL.: "Expression of FACT in mammalian tissues suggests its role in maintaining of undifferentiated state of cells", *ONCOTARGET, IMPACT JOURNALS LLC, UNITED STATES*, vol. 2, no. 10 1 October 2011 (2011-10-01), pages 783-796, XP008163679, ISSN: 1949-2553. Retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248156/> [retrieved on 2011-10-13], abstract page 1, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1, page 3, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1, page 10, column 2, paragraph 3, page 12, column 2, paragraph 2

VALERIA DI&EMSP14; BUSSOLO ET AL.: "Curaxins: A New Family of Non-genotoxic Multitargeted Anticancer Agents", *CHEMMEDCHEM*, vol. 6, no. 12, 28 October 2011 (2011-10-28), pages 2133-2136, XP055071667, ISSN: 1860-7179, DOI: 10.1002/cmdc.201100476, page 2133, column 2, last paragraph - page 2135, column 2, last paragraph, figures scheme 1, figure 2, table 1

WO-A2-2009143290

KOMAN IGOR E. ET AL.: "Targeting FACT Complex Suppresses Mammary Tumorigenesis in Her2/neu Transgenic Mice", *CANCER PREVENTION RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, UNITED STATES*, vol. 5, no. 8, 1 August 2012 (2012-08-01), pages 1025-1035, XP008163674, ISSN: 1940-6207, DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0529, retrieved on 2012-06-11], abstract, page 1025, column 2, paragraph 2, page 1026, column 1, paragraph 2, page 1027, column 1, last paragraph, page 1027, column 2, paragraph 4-5, page 1028, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1, figure 2, page 1029, column 1, paragraph 2, page 1031, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1, page 1032, column 1, last paragraph - page 1034, column 1, paragraph 1

**(57)** Настоящее изобретение относится к новому способу предотвращения вызванного канцерогеном рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества соединения формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат; причем карциноген представляет собой генотоксический карциноген, и рак представляет собой рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

**B1****028630****028630****B1**

### Приоритет

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 61/616216, поданной 27 марта 2012 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки во всей ее полноте.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к способу, полезному при предотвращении вызванного канцерогеном рака, включая, например, рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

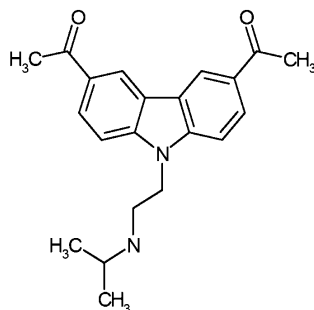
### Уровень техники

Лечение различных видов рака может основываться на характеристиках рака, которые в некоторых случаях включают молекулярный анализ опухоли. Варианты лечения больных раком включают хирургию, а лучевую терапию и химиотерапию также используют в качестве альтернативной или дополнительной терапии. Кроме того, в некоторых случаях используют гормональную терапию или эндокринную терапию. Все эти варианты лечения омрачены нежелательными побочными эффектами и/или снижением эффективности, если подобраны не тщательно для конкретной опухоли.

Таким образом, остается потребность в способах, которые полезны для лечения рака и связанных с ним заболеваний, в том числе на персонализированной основе.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способ предотвращения вызванного канцерогеном рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества соединения формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат; причем канцероген представляет собой генотоксический канцероген, и рак представляет собой рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

Детали изобретения изложены в прилагаемом описании ниже. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны здесь, могут быть использованы при осуществлении или тестировании настоящего изобретения, иллюстративные способы и материалы описаны ниже. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают также множественное число, если из контекста явно не следует иное. Если не определено иначе, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области, к которой это изобретение относится.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрирована безопасность при длительном приеме кураксина-137 с питьевой водой. Фиг. 1А-Е показывают группы мышей ММТV-neu (n=5/группу), которым давали обычную воду (контроль) или растворы кураксина-137 (0,1 или 0,2 мг/мл) ad libitum с 4 до достижения 14-недельного возраста.

На фиг. 1А показано, что скорость потребления жидкости мышами ММТV-была похожей для групп, получавших обычную воду или растворы кураксина-137 (0,1 или 0,2 мг/мл). Ось Y - подсчитанное количество потребляемой воды каждой мышью в клетке в день, исходя из взвешивания бутылок один раз в неделю.

На фиг. 1В проиллюстрирована фактическая доза кураксина-137, доставленная с питьевой водой. Средняя суточная доза кураксина-137 была рассчитана с использованием измерений от А и С.

На фиг. 1С проиллюстрированы получавшие кураксин и контрольные мыши, набравшие вес при подобных скоростях. Средний вес тела мышей в трех исследуемых группах показан отнесенным к среднему весу в каждой группе в 4-недельном возрасте. Столбцы ошибок указывают среднее отклонение между 5 мышами на группу.

На фиг. 1D проиллюстрированы кривые выживаемости, полученные по методу Каплана-Мейера, иллюстрирующие не связанную с опухолью смертность животных ММТV-neu в трех исследуемых группах. Группа 0,1 мг/мл начала лечение в 4-недельном возрасте, а группа 0,2 мг/мл - в 10-недельном возрасте. У мышей, которые умерли до достижения 44-недельного возраста, не было видимых или прощупываемых опухолей. Данные анализировали с использованием MedCalc v.11,3.3, а кривые выживаемости сравнивали, используя логарифмический ранговый критерий,  $p > 0,1$  для каждой получавшей кураксин группы в сравнении с контрольной группой.

На фиг. 1Е представлен анализ иерархической группировки профилей экспрессии генов в образцах, выделенных от 2 мышей в каждой исследуемой группе, контроле (простая вода) и получавших 0,1 и 0,2 мг/мл кураксина-137 с 4 до 14-недельного возраста. РНК печени и селезенки были проанализированы.

На фиг. 2 проиллюстрировано отсутствие морфологических изменений органов мышей MMTV-neu, получавших кураксин-137 в возрасте от 4 до 14 недель. По 5 животных из группы подвергались "слепому" гистопатологическому анализу. Из большинства органов готовили H&E-окрашенные срезы.

На фиг. 2А проиллюстрированы образцы костного мозга (первая колонка) из трех групп мышей, продемонстрировавшие плотно упакованные кроветворные клетки всех линий и разной зрелости, что указывает на активный гемопоэз. Образцы селезенки мышей из всех групп (колонка 2 и 3) имели нормальную морфологию с лимфоидными клетками в белой пульпе и активный гемопоэз в красной пульпе.

На фиг. 2В проиллюстрирована морфология печени (первая колонка), легких (вторая колонка) и почек (третья колонка). Гистология печени была нормальной у всех мышей с более компактной цитоплазмой перипортальных гепатоцитов и менее вакуолярной цитоплазмой клеток вокруг терминальной вены долек. Все мыши продемонстрировали нормальную гистологию легких (альвеол, бронхиол и кровеносных сосудов) и почек (клубочков и канальцев).

На фиг. 2С проиллюстрирована морфология желудочно-кишечного тракта. Нормальная морфология образцов из кишечника всех мышей с неизменной поверхностью эпителия, ворсинок, собственной пластинки, крипт и слизистой лимфоидной ткани.

На фиг. 3 проиллюстрировано действие длительного введения кураксина-137 на общую и безопухолевую жизнеспособность самок трансгенных мышей MMTV-neu.

На фиг. 3А показано, что кураксин-137 (в данном документе, CBL 137) продлевает общую жизнеспособность мышей дозозависимым способом. Кривые выживаемости, полученные по методу Каплана-Мейера, проиллюстрированы для каждой группы животных (контроль-регулярно пьющий воду, или 0,1 или 0,2 мг/мл кураксина-137 (CBLC137) в питьевой воде в возрасте от 4 до 14 недель; n=19-25/группу). Данные анализировали с использованием MedCalc v.11.3.3, а кривые выживаемости сравнивали, используя логарифмический ранговый критерий,  $p < 0,0001$  для обеих получавших кураксин групп.

На фиг. 3В показано, что начало опухоли (появление видимых опухолей) было отсроченным у животных, получавших кураксин-137 (CBL 137), дозозависимым способом. Кривые Каплана-Мейера безопухолевой выживаемости были построены для групп, описанных в А, и анализировались как в А;  $p < 0,001$  для обеих получавших кураксин групп.

На фиг. 3С продемонстрировано опухолевое разнообразие в трех группах мышей, представленное как среднее количество опухолей разных категорий размеров (большие, средние, малые) у мышей, определенных при аутопсии. Столбцы ошибок - стандартное отклонение между 19-25 проанализированными животными на каждую группу. Звездочки указывают на существенное отличие от нелеченых животных (t-тест,  $p < 0,05$ ).

На фиг. 4 представлена схема эксперимента по исследованию DMH.

На фиг. 5 проиллюстрированы динамические изменения веса тела мышей в продолжение всего исследования DMeH.

В табл. 1 представлена концентрация кураксина-137 (мкМ) в мышечной плазме и тканях (среднее +/- SD в мкМ, n=4) спустя 10 недель после начала обработки (14-недельный возраст).

В табл. 2 представлены гистологические показатели у старых животных в каждой испытательной группе (2 мыши на группу).

В табл. 3 представлен коэффициент заболеваемости опухолью, индуцированной DMH у самок мышей.

В табл. 4 представлен коэффициент заболеваемости опухолью, индуцированной DMH у самцов мышей.

В табл. 5 представлен вес органов, извлеченных во время аутопсии из самок животных в DMH-исследовании.

В табл. 6 представлен вес органов, извлеченных во время аутопсии из самцов животных в DMH-исследовании.

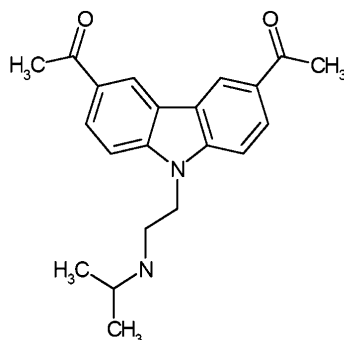
В табл. 7 представлены макроскопические изменения в органах самок мышей.

В табл. 8 представлены макроскопические изменения в органах самцов мышей.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение основывается, частично, на обнаружении того, что кураксины обладают противораковым действием на карциномы, что характеризуется определенными молекулярными маркерами, включая ER, PR, HER2 и FACT, но не ограничивается ими.

Настоящее изобретение предусматривает способ предотвращения вызванного канцерогеном рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества соединения формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, причем карциноген представляет собой генотоксический карциноген, и рак представляет собой рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

Следующие определения используются относительно изобретения, раскрытого в данном документе. Если не определено иное, то все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют те же значения, что и понятные для специалиста в области техники, к которой относится изобретение.

Как использовано в данном документе, форма единственного числа может означать и множественное число. Кроме того, термин "приблизительно", когда используется по отношению к числовому показателю, означает указанный числовой показатель плюс или минус до 10% от указанного числового показателя. Например, формулировка "приблизительно 50" охватывает диапазон от 45 до 55.

Термин "применять", "вводить" или "введение", как использовано в этом описании, относится к непосредственному введению субъекту соединения или фармацевтически приемлемой соли соединения, или композиции, или введению субъекту конъюгата пролекарства или аналога соединения или фармацевтически приемлемой соли соединения, или композиции, которые могут образовывать эквивалентное количество активного соединения в организме субъекта.

Термин "алкил", как использовано в данном документе, если не указано иное, относится к неразветвленной или разветвленной ненасыщенной группе, полученной из алкана путем удаления атомов водорода. Репрезентативные алкильные группы с неразветвленной цепью включают -метил, -этил, -n-пропил, -n-бутил, -n-пентил и n-гексил, но не ограничиваются ими. Репрезентативные алкильные группы с разветвленной цепью включают изопропил, -сек-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил, -неопентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, 1,1-диметилпропил и 1,2-диметилпропил, но не ограничиваются ими.

Термин "носитель", как использовано в этом описании, охватывает носители, эксципиенты и разбавители и означает материал, композицию или наполнитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулированный материал, вовлеченный в перенос или транспортировку фармацевтического агента из одного органа или части тела в другой орган или часть тела.

Хотя неограниченный термин "содержащий" в качестве синонима таких терминов, как "включающий" или "имеющий", используется в данном документе для описания и притязаний изобретения, настоящее изобретение или варианты его реализации могут альтернативно быть описаны с использованием альтернативных терминов, таких как "состоящий из" или "состоящий, по сути, из".

Термин "болезнь" используется в этом описании для обозначения и используется взаимозаменяемо с терминами "заболевание", "состояние" или "недуг", если не указано иное.

"Эффективное количество", когда используется в связи с соединением, описанным в данном документе, представляет собой количество, которое является эффективным для обеспечения ощутимого лечения, предотвращения или снижения патогенеза рака или родственных заболеваний, таких как, например, рак молочной железы.

"Гормональная терапия" является противораковой терапией, которая может включать манипулирование эндокринной системой. Эта терапия может включать лекарственные средства, которые ингибируют продуцирование или активность гормонов (антагонисты гормонов), например.

"Гормональная терапия" является противораковой терапией, которая может включать манипулирование эндокринной системой. Эта терапия может включать лекарственные средства, которые ингибируют продуцирование или активность гормонов (антагонисты гормонов), например.

Термин "гидроксил" означает -ОН.

"Субъект" является млекопитающим, например, человеком (например, женщиной или мужчиной), мышью, крысой, морской свинкой, собакой, кошкой, лошастью, коровой, свиньей или нечеловеческим приматом, таким как обезьяна, шимпанзе, бабуин или макак-резус, и термины "субъект" и "пациент" в данном документе используются взаимозаменяемо.

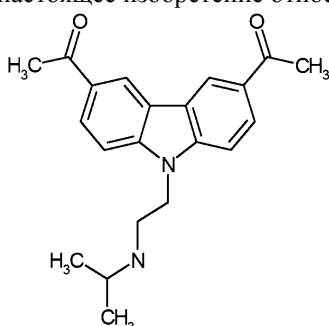
Термин "лечение", по отношению к субъекту, означает улучшение по меньшей мере одного симптома заболевания субъекта. Лечение может быть излечиванием, улучшением или, по меньшей мере,

частичным ослаблением болезни, включая рак или родственные заболевания, такие как, например, рак молочной железы. Лечение может оцениваться с использованием разных конечных точек, включая общую выживаемость, интервал без признаков развития, интервал без признаков заболевания или полный патологический ответ.

Как указано в данном документе, все процентные отношения композиций представляют собой процентное содержание по весу всей композиции, если не указано иное. Как использовано в данном документе определение "включает" и его варианты предназначены не для ограничения, то есть перечисление элементов в перечне не исключает другие подобные элементы, которые могут также быть полезными в материалах, композициях, устройствах и способах этой технологии. Аналогично, определения "могут" и "может" и их варианты предназначены не для ограничения, так как перечисление того, что вариант реализации может содержать определенные элементы или признаки, не исключает другие варианты реализации настоящей технологии, которые не содержат этих элементов или признаков.

Обычно, композиции согласно изобретению содержат карбазольное соединение. Пригодные карбазольные соединения и способы их получения описаны в PCT/US 2009/059558, поданной 5 октября 2009 года, полное описание которой включено в данный документ путем ссылки. В некоторых вариантах реализации, карбазол представляет собой соединение, указанное в данном документе как кураксин.

В разных вариантах реализации настоящее изобретение относится к соединению формулы



или его фармацевтически приемлемой соли или гидрату.

Соединение указано выше как кураксин и, в частности, указано в данном документе как кураксин-137, и/или CBL-137, и/или CBL0137.

В разных вариантах реализации настоящее изобретение относится к раку. Рак или опухоль относится к неконтролируемому росту клеток и/или аномально повышенной выживаемости клеток, и/или ингибированию апоптоза, которые мешают нормальному функционированию телесных органов и систем. Субъект, который страдает раком или у которого диагностирована опухоль, является субъектом, имеющим объективно заметные раковые клетки, присутствующие в организме субъекта. Включенными в это изобретение являются доброкачественный и злокачественный рак, а также латентные опухоли или метастазы. Рак, который мигрирует из своего исходного положения и обсеменяет жизненно важные органы, может в конце концов приводить к смерти субъекта по причине функциональной деградации пораженных органов.

В разных вариантах реализации изобретение применяется к метастатическому раку или метастатическому раку. Метастаз относится к распространению рака из его исходного положения в другие места в организме. Раковые клетки могут отделяться от исходной опухоли, пенетрировать в лимфатические и кровяные сосуды, циркулировать через кровяной поток и расти в отдаленной точке (метастазировать) в нормальных тканях где-то в другом месте организма. Метастаз может быть локальным или удаленным. Метастазис является непрерывным процессом, возможным из-за отделения опухолевых клеток от исходной опухоли, передвижения посредством кровотока и остановки в отдаленном участке. На новом участке клетки налаживают кровоснабжение и могут расти до образования опасной для жизни массы. Стимулирующий и ингибирующий молекулярные метаболические пути в опухолевой клетке регулируют это свойство; взаимодействия между опухолевой клеткой и клетками-хозяевами в отдаленном участке также являются важными.

Метастазы часто выявляют благодаря исключительно или комбинированному использованию сканирований с помощью ядерного магнитного резонанса (MRI), сканирований с помощью компьютерной томографии (СТ), подсчету кровяных элементов и тромбоцитов, исследования функций печени, рентгенографических сканирований грудной клетки и костей в дополнение к мониторингу специфических симптомов.

Способы и композиции, описанные в данном документе, направлены на предупреждение рака и/или предупреждение роста, прогрессирования и/или метастазирования злокачественных опухолей и пролиферативных нарушений, связанных с повышенной выживаемостью клеток или ингибированием апоптоза.

В разных вариантах реализации настоящее изобретение относится к способам предотвращения рака, вызванного канцерогеном. В некоторых вариантах реализации изобретение относится к способам

предотвращения рака, вызванного генотоксическим канцерогеном.

В некоторых вариантах реализации изобретения канцероген является канцерогеном, который классифицирован в Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Международного агентства онкологических исследований (IARC), включая группу 1 карциногенов (агенты, которые точно канцерогенны для людей). Обстоятельство выделения влечет за собой воздействия, которые канцерогенны для людей), группа 2А (агенты, которые вероятно карциногенны для людей). Обстоятельство выделения влечет за собой воздействия, которые вероятно канцерогенны для людей), группа 2В канцерогенов (агенты, которые возможно карциногенны для людей).

Обстоятельство выделения влечет за собой воздействия, которые возможно канцерогенны для людей), группа 3 канцерогенов (агенты, которые не поддаются классификации относительно их онкогенности для людей) и группа 4 канцерогенов (агенты, которые, следует полагать, не онкогенны для людей). Неограничивающими примерами канцерогенов являются диоксины и диоксинподобные соединения, бензол, кепон, EDB, асбест, промышленный дым и табачный дым, бензо[а]пирен, нитрозамины (такие как нитрозонорникотин) и реактивные альдегиды (такие как формальдегид), винилхлорид, мышьяк, асбест, кадмий, соединения гексавалентного хрома (VI), дизельные выхлопы, этиленоксид, никель, радон и продукты его распада, радий-226, радий-224, плутоний-238, плутоний-239 и другие излучатели альфа-частиц с высокой атомной массой и так далее.

В некоторых вариантах реализации изобретения канцерогеном является диметилгидразин (DMH). В некоторых вариантах реализации канцерогеном является 1,2-DMH и/или его несимметрический аналог 1,1-DMH. В некоторых вариантах реализации изобретения эти способы включают введение эффективного количества кураксина 137 или его фармацевтически приемлемой соли.

Как 1,2-DMH, так и его несимметрический аналог 1,1-DMH, являются человеческими карциногенами. Гидразин и его производные являются официально признанными человеческими карциногенами в законах Российской Федерации (Sanitation Regulation and Hygienic norms 1,2.2353-08 "Carcinogenic factors and main requirements to prevention of carcinogenic risk"). 1,1-DMH широко используется в авиакосмической промышленности в качестве важного компонента ракетного топлива. Тысячи человек привлекаются к его производству и использованию, многие из них находятся в группе высокого онкогенного риска, так как у них имеются симптомы отравления 1,1-DMH.

Считается, что 1,2-DMH является "абсолютным канцерогеном", т.е. он может не только инициировать образование опухоли, но также способствовать ее прогрессированию. Без стремления быть связанным с теорией, не верится, что сам DMH непосредственно вызывает мутации. Однако когда его вводят в организм, он может подвергаться метаболической трансформации в печени и других тканях, которые подверглись микросомальному окислению ксенобиотиками. Сопродукты этих реакций включают образование алкилированных производных, которые обладают способностью поражать ДНК. Без намерения быть связанными с теорией, считается, что образование активных форм кислорода в результате метаболических превращений DMH приводит к его способности стимулировать рост опухоли. На уровне молекулярной передачи сигнала стимулирование опухоли модулируется активностью компонентов стрессового метаболического пути, которые включают фактор транскрипции p53, NF-kB и фосфатидилинозитол-3-киназы/MTOR.

Без стремления быть связанным с теорией, DMH обладает признаком развития рака - промутагенное поражение Об-MeG, которое вызывает переход GC в AT *in vitro* и *in vivo*. Это единственная мутация, индуцированная в *E.coli* и *Salmonella* после воздействия DMH. Кроме того, мутации GC в AT были обнаружены в K-Ras протоонкогене в DMH-индуцированной опухоли у крыс.

DMH вызывает опухоли многих разновидностей, включая аденокарциномы и полипы толстой кишки, плоскоклеточный рак околоанальной кожи, гепатомы и гемангиоэндотелиомы; опухоли, саркомы матки, аденокарциномы яичников; ангиосаркомы надпочечников и кистозные и солидные почечные аденомы, но не ограничиваясь ими.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ предотвращения вызванного канцерогеном рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества кураксина-137 или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, причем канцероген представляет собой генотоксический канцероген, и рак представляет собой рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

В некоторых вариантах реализации изобретения профилактические способы включают введение агента субъекту, который может страдать от рака. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется одним или более факторов высокого риска развития рака, генетической предрасположенностью к раку (например, генетические факторы риска), предыдущим эпизодом рака (например, новый рак и/или рецидив), семейным анамнезом рака и воздействием индуцирующего рак агента (например, экологического агента).

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется высоким риском развития рака. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется генетической предрасположенностью к раку. В некоторых вариантах реализации изобретения генетическая предрасположенностью к

раку представляет собой генетический фактор риска, как это известно из уровня техники. Такие факторы риска могут включать, в качестве примера, HNPCC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, по меньшей мере, для рака толстой кишки, матки, тонкой кишки, желудка, мочевого пути. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется предыдущим эпизодом рака. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект был поражен 1 или 2, или 3, или 4 или 5, или 6 предыдущими эпизодами рака. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется семейным анамнезом рака. В некоторых вариантах реализации изобретения родитель, и/или дедушка, и/или брат, и/или тетя/дядя, и/или двоюродная бабушка/двоюродный дедушка, и/или двоюродный брат страдал или страдает от рака. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект, вероятно, будет страдать от рака, если субъект характеризуется воздействием онкогенного агента (например, агента окружающей среды). Например, повреждение кожи воздействию интенсивного солнечного света является одним из факторов риска развития рака кожи. В качестве примера, курение является фактором риска для рака легкого, полости рта, гортани, мочевого пузыря, почек и нескольких других органов.

В определенных вариантах реализации настоящее изобретение предусматривает предотвращение рака, вызванного канцерогеном. В некоторых вариантах реализации изобретения канцерогеном является 1,2-DMH и/или его несимметрический аналог 1,1-DMH. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее изобретение включает выбор субъекта, который подвергался или будет подвергаться действию карциногена.

Любой агент, описанный в настоящем документе, может иметь соответствующую основную функциональную группу, которая может реагировать с неорганической или органической кислотой, или карбоксильную группу, которая может реагировать с неорганическим или органическим основанием, чтобы образовать фармацевтически приемлемую соль. Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты образуется из фармацевтически приемлемой кислоты, как это хорошо известно из уровня техники. Такие соли включают перечисленные в *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) и *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002, которые во всей полноте включены в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтически приемлемые соли включают, но не в качестве ограничивающего примера, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкаронат, сахарат, формат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, *p*-толуолсульфонат, камфоросульфат, памоат, фенилацетат, трифторацетат, акрилат, хлорбензол, динитробензоат, гидроксibenзоат, метоксibenзоат, метилбензоат, *o*-ацетоксibenзоат, нафтален-2-бензоат, изобутират, фенилбутират,  $\alpha$ -гидроксibuтират, бутин-1,4-дикарбоксилат, гексин-1,4-дикарбоксилат, капрат, каприлат, циннамат, гликолят, гептаноат, гиппурат, малат, гидроксималеат, малонат, манделат, мезилат, никотинат, фталат, терафталат, пропионат, пропионат, фенилпропионат, себакат, суберат, *p*-бромбензолсульфонат, хлорбензолсульфонат, этилсульфонат, 2-гидроксиэтилсульфонат, метилсульфонат, нафтален-1-сульфонат, нафтален-2-сульфонат, нафтален-1,5-сульфонат, ксиленсульфонат и тартрат.

Термин фармацевтически приемлемая соль также относится к соли соединений согласно настоящему изобретению, имеющих кислотную функциональную группу, такую как карбоксильная функциональная группа, и основанию. Пригодные основания включают гидроксиды щелочных металлов, таких как натрий, калий и литий; гидроксиды щелочно-земельных металлов, таких как кальций и магний; гидроксиды других металлов, таких как цинк; аммоний и органические амины, такие как незамещенные или гидроксизамещенные моно-, ди- или триалкиламины, дициклогексиламин; трибутиламин; пиридин; *N*-метил, *N*-этиламин; диэтиламин; триэтиламин; моно-, бис- или трис-(2-ОН-низшие алкиламины), такие как моно-, бис- или трис-(2-гидроксиэтил)амин, 2-гидрокси-трет-бутиламин, или трис-(гидроксиметил)метиламин, *N,N*-ди-низший алкил-*N*-(гидроксил-низший алкил)-амины, такие как *N,N*-диметил-*N*-(2-гидроксиэтил)амин или трис-(2-гидроксиэтил)амин; *N*-метил-*D*-глюкамин; и аминокислоты, такие как аргинин, лизин и подобные, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах реализации изобретения репрезентативные фармацевтические соли включают, например, водорастворимые и водонерастворимые соли, такие как ацетат, амсонат (4,4-диаминостилбен-2,2-дисульфат), бензолсульфонат, бензонат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, бутират, кальций, эдетат кальция, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, клавуариат, дигидрохлорид, эдетат, эдизилат, эстолат, эзилат, фумарат, глутептат, глюконат, глутамат, гликолиларсенилат, гексафторфосфат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изотианат, лактат, лактобионат, лаурат, магний, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, *N*-метилглюкаминаммониевая соль, 3-гидрокси-2-нафтоат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат (1,1-метен-бис-2-гидрокси-3-нафтоат, эйнбонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, пикрат, полигалактуронат, пропионат, *p*-толуенсульфонат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, сульфосалицилат, сурамат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, тритийодид и валерат.

Кроме того, любой агент, описанный в настоящем документе, можно вводить субъекту в качестве

компонента композиции, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Такие композиции необязательно содержат соответствующее количество фармацевтически приемлемого эксципиента для обеспечения формы для надлежащего введения.

Фармацевтические эксципиенты могут быть жидкостями, такими как вода или масло, включая продукты нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, сезамовое масло и подобные. Фармацевтические эксципиенты могут быть солевым раствором, аравийской камедью, желатином, крохмальной пастой, тальком, кератином, коллоидный кремнезёмом, мочевиной и подобным. В дополнение могут быть использованы вспомогательные, стабилизирующие, сгущивающие, смазывающие и окрашивающие агенты. В одном варианте реализации, фармацевтически приемлемые эксципиенты являются стерильными, когда вносятся субъекту. Вода является полезным эксципиентом, когда любой агент, описанный в настоящем документе, вводят внутривенно. Солевые растворы и водные декстрозы, и растворы глицерина также могут применяться в качестве жидких эксципиентов, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты также включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, мелкий порошок, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеролмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобное. Любой агент, описанный в настоящем документе, если желательным, также может содержать малые количества смачивающего или эмульгирующего агентов, pH буферных агентов.

Любое вещество, описанное в данном документе, может принимать форму раствора, суспензии, эмульсии, таблеток, пилюль, пелет, капсул, содержащих жидкость капсул, порошков, препаратов длительного высвобождения, суппозиторий, эмульсий, аэрозолей, спреев, суспензий или любую другую форму, пригодную для использования. Другие примеры пригодных эксципиентов описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19<sup>th</sup> ed. 1995), включенный в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации любое вещество, описанное в данном документе, получают в соответствии с рутинными процедурами, как и композицию, адаптированную для орального введения человеку. Композиции для оральной доставки могут быть в форме таблеток, лепешек, водных или масляных суспензий, гранул, порошков, эмульсий, капсул, сиропов или эликсиров, например. Орально вводимые композиции могут содержать один или более агентов, например, подсластителей, таких как фруктоза, аспартам или сахарин; ароматизаторов, таких как мята, масло грушанки или черешни; красители; и консерванты, для обеспечения фармацевтически приятного на вкус препарата. Кроме того, при получении таблеток или пилюль композиции могут быть покрыты оболочкой, чтобы предотвратить распад и абсорбцию в желудочно-кишечном тракте, тем самым обеспечивая длительное действие в течение расширенного периода времени. Селективно проницаемые мембраны, окружающие осмотически активное движущееся любое вещество, описанное в данном документе, также пригодны для орального введения композиций. В этих последних платформах жидкость из внешней среды, окружающей капсулу, всасывается движущимся соединением, которое разбухает, чтобы вытеснить вещество или композицию вещества через отверстие. Эти доставочные платформы могут обеспечить профиль доставки по сути нулевого порядка в противоположность зубчатым профилям препаратов немедленного высвобождения. Полезным также может быть задерживающий высвобождение материал, такой как глицеринмоностеарат или глицеринстеарат. Оральные композиции могут содержать стандартные эксципиенты, такие как маннитол, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарид натрия, целлюлоза и карбонат магния. В одном варианте реализации эксципиенты являются фармацевтически чистыми.

Ингредиенты могут поставляться отдельно или смешанными вместе в единую дозированную форму, например, в качестве предварительно смешанного раствора, сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула, предварительно заполненный шприц или саше, указывающие количество активного вещества. Когда любое вещество, описанное в данном документе, вводят путем инфузии, оно может приготавливаться и распределяться, например, с инфузионной бутылкой, содержащей фармацевтически стерильную воду или солевой раствор. Когда любое вещество, описанное в данном документе, вводят путем инъекции, предусмотрены ампулы со стерильной водой для инъекции или солевым раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Любое вещество, описанное в данном документе, может вводиться способом контрольного высвобождения или длительного высвобождения или с помощью доставляющего устройства, которые хорошо известны специалистам в данной области. Примеры включают те, которые описаны в патентах США № 3845770; 3916899; 3536809; 3598123; 4008719; 5674533; 5059595; 5591767; 5120548; 5073543; 5639476; 5354556 и 5733556, каждый из которых во всей полноте включен в данный документ посредством ссылки, но не ограничиваются ими. Эти дозированные формы могут быть полезными для обеспечения контролируемого или длительного высвобождения одного или более активных ингредиентов с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы или других полимерных матриц, гелей, проницаемых мембран, осмотических систем, многослойных покрытий, микрокапсул, липосом, микросфер или их комбинации для обеспечения желательного профиля высвобождения в изменяющихся пропорциях. Из-



вестные специалисту в данной области рецептуры контролируемого или длительного высвобождения, включая те, что описаны в настоящем документе, можно легко выбрать для использования с активными ингредиентами веществ, описанных в данном документе. Изобретение, таким образом, предусматривает формы разовых единиц дозирования, пригодные для орального введения, такие как таблетки, капсулы, желатиновые капсулы и каплеты, которые приспособлены для контролируемого или длительного высвобождения, но не ограничиваются ими.

Контролируемое или длительное высвобождение активного ингредиента может стимулироваться разными условиями, включая изменение pH, изменение температуры, стимулирование с помощью света пригодной длины волны, концентрацию или доступность ферментов, концентрацию или доступность воды или другие физиологические условия и соединения, но не ограничиваясь ими.

Композиции могут быть приготовлены с помощью обычных способов смешивания, гранулирования, покрытия или полимеризации соответственно, и настоящие композиции могут содержать в одном варианте реализации от приблизительно 0,1% до приблизительно 99%; и в другом варианте реализации от приблизительно 1% до приблизительно 70% любого вещества, описанного в данном документе, по весу или объему.

В другом варианте реализации любое вещество, описанное в данном документе, действует синергически, когда вводится с другим веществом, и его вводят в дозах, которые ниже тех доз, которые обычно применяются, когда такое вещество используется в качестве монотерапии. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения кураксин-137 или его фармацевтические соли и дополнительное терапевтическое вещество или его фармацевтические соли могут давать больше, чем суммарный эффект, когда вводятся в комбинации или конъюгированными. В некоторых вариантах реализации изобретения кураксин-137 или его фармацевтические соли и дополнительное терапевтическое вещество или его фармацевтические соли могут давать синергетический эффект, когда вводятся в комбинации или конъюгированными.

Например, дозирование любого вещества, описанного в данном документе, а также график дозирования могут зависеть от разных параметров, включая тип рака (например, рак молочной железы), подлежащий лечению, общее состояние здоровья пациента и рассудительность медицинского работника, производящего введение, но не ограничиваясь ими. Любое вещество, описанное в данном документе, может вводиться перед (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно с или после (например, спустя 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения дополнительного терапевтического вещества субъекту, нуждающемуся в этом. В разных вариантах реализации любое вещество, описанное в данном документе, может вводиться на расстоянии 1 минуты, на расстоянии 10 мин, на расстоянии 30 мин, на расстоянии меньше, чем 1 ч, на расстоянии 1 с половиной часа, на расстоянии от 1 ч до 2 ч, на расстоянии от 2 ч до 3 ч, на расстоянии от 3 ч до 4 ч, на расстоянии от 4 ч до 5 ч, на расстоянии от 5 ч до 6 ч, на расстоянии от 6 ч до 7 ч, на расстоянии от 7 ч до 8 ч, на расстоянии от 8 ч до 9 ч, на расстоянии от 9 ч до 10 ч, на расстоянии от 10 ч до 11 ч, на расстоянии от 11 ч до 12 ч, на расстоянии не более чем 24 ч или на расстоянии не более чем 48 ч.

Количество любого вещества, описанного в данном документе, которое смешивается с материалом носителя для получения разовой дозы, может изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Чтобы помочь определить оптимальный диапазон дозирования, могут применяться анализы *in vitro* или *in vivo*.

Обычно, полезные дозы известны из уровня техники. Например, дозы можно определить, ссылаясь на Physicians' Desk Reference, 66<sup>th</sup> Edition, PDR Network; 2012 Edition (December 27, 2011), содержание которого включено в данный документ во всей полноте.

Дозирование любого вещества, описанного в данном документе, может зависеть от нескольких факторов, включая тяжесть состояния, подлежащего лечению или предотвращению, возраст, вес и здоровье субъекта, подлежащего лечению. Кроме того, фармакогеномная (действие генотипа на фармакокинетику фармакодинамику или профили эффективности терапевтического вещества) информация о конкретном субъекте может влиять на используемое дозирование. Более того, точные индивидуальные дозирования могут отчасти приспосабливаться в зависимости от разных факторов, включая специфическую комбинацию веществ, подлежащих введению, время введения, путь введения, природу рецептуры, скорость выведения, конкретный тип рака (например, рак молочной железы), подлежащий лечению, серьезность нарушения и анатомическое местоположение нарушения. Предполагаются некоторые изменения в дозировании.

Как правило, при оральном введении млекопитающему дозирование любого вещества, описанного в данном документе, составляет от 0,001 мг/кг/день до 100 мг/кг/день, от 0,01 мг/кг/день до 50 мг/кг/день или от 0,1 мг/кг/день до 10 мг/кг/день. При оральном введении человеку дозирование любого вещества, описанного в данном документе, обычно составляет от 0,001 мг до 1000 мг в день, от 1 мг до 600 мг в день, или от 5 мг до 30 мг в день. В одном варианте реализации оральная доза составляет 600 мг в день. В одном варианте реализации оральная доза составляет две дозы по 300 мг в день. В другом варианте



торых случаях. Система доз может вводиться в качестве однократной дозы или поделенной на многократные дозы. Обычно, желательную дозу вводят при установленных интервалах в течение длительного периода, обычно, по меньшей мере, в течение нескольких недель или месяцев, хотя могут быть необходимыми более длительные периоды введения, составляющие несколько месяцев или лет, или более.

Схема приёма лекарственного средства, использующая любое вещество, описанное в данном документе, может быть выбрана в соответствии с рядом факторов, включая тип, вид рака, возраст, вес, пол и медицинское состояние субъекта; тяжесть состояния, подлежащего лечению; путь введения; функционирование почек и печени субъекта; фармакогеномный характер индивидуума; и применяемое специфическое соединение в соответствии с изобретением. Любое вещество, описанное в данном документе, можно вводить в однократной суточной дозе или в суммарной суточной дозе, которую можно вводить в разделенных дозах два, три или четыре раза в день. Кроме того, любое вещество, описанное в данном документе, можно вводить постоянно, а не периодически, в продолжение схемы приёма лекарственного средства.

Введенная дозировка представляет собой эффективное количество вещества. Эффективные количества, токсичность и терапевтическую эффективность можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или экспериментальных животных, включая определение LD<sub>50</sub> (доза, летальная для приблизительно 50% популяции) и/или ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная для приблизительно 50% популяции), но не ограничиваясь ими. Дозирование может изменяться в зависимости от применяемой дозированной формы и используемого пути введения. Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами - это терапевтический индекс, который может быть представлен как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Композиции и способы, которые демонстрируют большие терапевтические индексы, могут быть отобраны для использования в некоторых вариантах реализации изобретения.

Терапевтически эффективную дозу можно рассчитать изначально из анализа клеточной культуры. Также, дозу можно определить в модели на животных для достижения диапазона концентрации, циркулирующего в плазме, который включает IC<sub>50</sub> (например, концентрация кураксина-137 и/или дополнительного терапевтического средства или его фармацевтически приемлемой соли, при которой достигается половина максимального ингибирования симптомов), как определено в культуре клеток или в приемлемой модели на животных. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения. Действия отдельной дозы можно мониторить с помощью пригодного биоанализа. Дозирование определяется врачом и приспосабливается, если необходимо, в ответ на наблюдаемые эффекты лечения.

Например, эффективность кураксина-137 или его фармацевтически приемлемой соли можно оценить путем измерения способности соединения ингибировать активность NF-κB или активировать p53. Активацию p53 можно измерить, используя анализ реакции на воздействие дозы, в котором чувствительная аналитическая система контактирует с представляющим интерес соединением через посредство ряда концентраций, включая концентрации, при которых эффект отсутствует или наблюдается минимальный эффект, через более высокие концентрации, при которых наблюдается частичный эффект, к насыщенным концентрациям, при которых наблюдается максимальный эффект. Теоретически, такие анализы ответа на воздействие дозы соединения-активатора можно описать как сигмоидальную кривую, изображающую степень активации как функции концентрации. Кривая, также теоретически, проходит через точку, в которой концентрация является достаточной для повышения активности до уровня, который составляет 50%, разница между исходной и максимальной активностью в анализе - значение EC<sub>50</sub>. Определение значения EC<sub>50</sub> осуществляют, используя стандартные биохимические (неклеточные) аналитические методы или аналитические методы с использованием клеток.

Сравнения эффективности активаторов часто предусматриваются со ссылкой на сравнительные значения EC<sub>50</sub>, причем более высокое значение EC<sub>50</sub> указывает на то, что исследуемое соединение является менее эффективным, а более низкое значение EC<sub>50</sub> указывает на то, что соединение является более эффективным, нежели контрольное соединение. Соединения согласно настоящему изобретению демонстрируют неожиданно значительную эффективность, например, активацию p53, в анализе люциферазной репортерной клеточной линии.

В некоторых вариантах реализации изобретения воздействие повлечет за собой количественные изменения, составляющие по меньшей мере приблизительно 10%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 50%, приблизительно 70% или приблизительно 90% или более. Терапевтический эффект также включает остановку или замедление прогрессирования основного заболевания или нарушения, не обращая внимания на то, реализуется ли улучшение.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество, которое будет лечить рак, будет модулировать симптомы, как правило, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40% или по меньшей мере приблизительно на 50%. В примерах реализации такие модуляции влекут за собой, например, статистически значимые количественные изменения численности раковых клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения это может быть снижением численности микрометастаз в отдаленные органы, снижением рекуррентности метастатического заболевания и так далее.

Это изобретение далее иллюстрируется следующими неограничивающими примерами.

#### Примеры

Пример 1: Кураксин-137 проявляет противоопухолевое действие при введении склонным к опухолям самкам мышей MMTV-Neu.

Способы, примененные в данном документе, известны из уровня техники. Детали некоторых из этих способов приведены ниже.

Химикаты и реагенты: кураксин-137, также известный как CBLC137 (>97% чистоты согласно HPLC и LC/MS), был специально синтезирован (Toronto, Canada). Для введения животным лекарственное средство растворяли в воде в количестве 0,1 или 0,2 мг/мл и хранили при комнатной температуре (RT). Стабильность соединения в воде при RT определяли в течение 2 месяцев в стандартном анализе по гену-репортёру активации p53 на клетках RCC45-p53-Luc, как описано (см. *Sci Transl Med* 2011 Aug 10;3(95):95ra74). Отличия между свежим и хранившимся растворами не были обнаружены. Hoechst 33358, R1881, TNF, тип III коллагеназы, гидрокортизон, инсулин и EGF были приобретены у Sigma (Sigma-Aldrich, Inc.). Растворы 100X пенициллина/стрептомицина и фунгициона, DMEM, глутамин, N-(2-гидроксипропил)пиперазин-N'-этансульфоновая кислота (HEPES), альбумин бычьей сыворотки (BSA), холерный токсин и Trizol были приобретены у Invitrogen, Inc.

Клетки: Клетки MDA-MB-453-MMTV-Luc (KB2) были приобретены у ATCC. H1299-kB-Luc, а клетки RCC45-p53-Luc были описаны ранее (см. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Nov 29; 102(48): 17448-53). Клетки выращивали на DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone) и другими стандартными добавками.

Клеточные культуры *ex vivo*: безопухолевые молочные железы или безнекротные молочные железы были взяты у глубоко анестезированных мышей в стерильных условиях, промыты в PBS, измельчены ножницами, а затем инкубировались в 0,1% коллагеназы III типа в полной культуральной среде (DMEM, обогащенный 100 ед./мл пенициллина, 100 пг/мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 0,075% BSA, 10 нг/мл холерного токсина, 0,5 пг/мл гидрокортизона, 5 пг/мл инсулина и 5 нг/мл EGF) в течение ночи при 37°C на качающейся платформе. После инкубирования клеточную суспензию центрифугировали при 40g в течение 1 мин. Супернатант сливали, а таблетку промывали один раз PBS, используя те же условия центрифугирования. Конечную таблетку ресуспендировали в полной культуральной среде и высеивали на пластиковые чашки. Полученную "органойдную" культуру использовали для эксперимента в течение одной недели без пересева.

Вестерн-блоттинг и иммунофлюоресцентное окрашивание проводили, используя стандартные процедуры. Использовали следующие исходные антитела: анти-ER $\alpha$  (SC-542, Santa Cruz, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:100), анти-Her2 (cat#2165, Cell Signaling, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:200), анти-PCNA (cat#2586, Cell Signaling, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:300), анти-SSRP1 (cat# 60970, Biolegend, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:200), анти-SPT16 (cat# 607002, Biolegend, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:200), анти-p53 (Pab421, SC-99 Santa Cruz, разбавление для WB составляло 1:1000, IF 1:200), анти-p65 (SC372 Santa Cruz, разбавление для IF составляло 1:200), анти- $\beta$ -actin (A3854, Sigma, разбавление для WB составляло 1:20,000) вторичные антимышинные или антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cell Signaling, разбавление для WB составляло 1:2) или Alexa Fluor 488 или 594 (A21202, A21207, Invitrogen, разбавление для IF составляло 1:500).

Иммуногистохимия: парафиновые срезы нарезали по 5 мкм, помещали на заряженные предметные стекла и высушивали при 60°C в течение одного часа. Предметные стекла охлаждали до RT, депарафинизировали в трех сменах ксилена и регидратировали, используя набор спиртов повышающейся концентрации. Эндогенные пероксидазы тушили водной 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для извлечения антигенов предметные стекла нагревали в микроволнах в течение 20 мин в цитратном буфере (pH 6,0), охлаждали в течение 15 мин и промывали в растворе 0,1%PBS/Tween20. Предметные стекла затем загружали в Dako Autostainer и блокировали в течение 5 мин с бессывороточным белковым блоком (Dako). После блокирования предметные стекла инкубировали с 0,2 мкг/мл козьим антимышиным SSRP1 поликлональным антителом (Santa Cruz, sc-5909) в течение 1 ч. Изотипически сходное контрольное антитело (0,2 мкг/мл козий IgG) использовали на дублирующем предметном стекле в местоположении исходного антитела в качестве негативного контроля. После промывания предметные стекла инкубировали с биотинилированным вспомогательным антикозьим IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), после чего окрашивали Elite ABC Kit (Vectastain) и хромогеном DAB (Dako). В заключение, окрашенные предметные стекла доокрашивали гематоксилином, дегидратировали, очищали и покрывали покрывным стеклом. Все предметные стекла сканировали, используя сканоскоп Aperio (Aperio Technologies, Inc.). Изображения получали, используя Image scope software (Aperio Technologies, Inc.).

Микроматричный анализ генной экспрессии: суммарную РНК выделили из замороженных образцов тканей, используя реагент TRIZOL (Invitrogen). Мечение мРНК и гибридизирование с MouseWG-6 v2.0 Expression. BeadChips, сканирование изображения и интенсивностную обработку проводили в соответствии с инструкциями производителя (Illumina, San Diego, CA). Файлы данных BeadChip анализировали с

помощью программного обеспечения Illumina GenomeStudio и R-базируемого программного пакета Bioconductor для определения уровней сигнала генов экспрессии. Применяли алгоритм иерархического сжатия, базирующийся на среднем сцеплении корреляций Пирсона. Данные поместили в базу данных NCBI GEO, номер доступа GSE33285.

Измерение концентраций кураксина-137 в мышечных тканях и плазме: извлечение лекарственного соединения было произведено в отделе химии Кливлендской BioLabs. Из исходной тканевой пробы отделили 70-100 мг образца. К образцу добавили охлажденный метанол (9× вес образца), образец механически гомогенизировали (Fisher Scientific PowerGen 125). Полученную суспензию образец/метанол затем покачивали в течение ночи при 4°C в холодильнике. Затем образцы центрифугировали, супернатант отбирали для анализа с помощью LC/MS/MS. Образцы плазмы извлекали, используя экстракционный раствор 0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (4× объем образца). Разбавленные образцы как следует встряхивали, а затем центрифугировали, полученный супернатант отбирали для анализа с помощью LC/MS/MS. Все приготовленные образцы хранили при 4°C прежде чем анализировать. Образцы анализировали по поводу кураксина-137, используя систему LC/MS/MS Applied Biosystems API 3000. Применяли способ градиентной HPLC с подвижными фазами: (A) 2 мМ ацетат аммония, 0,1% трифторуксусная кислота в воде и (B) 2 мМ ацетат аммония, 0,1% трифторуксусная кислота в метаноле. Инъекционный объем составлял 20 мкл, а скорость потока составляла 0,20 мкл/мин. Колонка Phenomenex Luna C18(2), 50×2,00 мм, частицы размером 5 мкм соединялись с проводником Phenomenex C18, 4×2,00 мм картридж/колонка. Масс-спектрометр использовала мониторинг множественных реакций (MRM) с однозарядным кураксином-137, выбранным при  $m/z$  337,20, подавая фрагментный ион при  $m/z$  86,00. Эксперименты на животных: все эксперименты на животных проводили в соответствии с одобренным IACUC протоколом Roswell Park Cancer Institute ("RPCI") и с руководством "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" National Research Council (ISBN 0-309-05377-3). Мыши FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J (именуемые в данном документе как "мыши MMTV-neu") были получены от Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) и разводились при необходимости в отделе лабораторных ресурсов (LAR) RPCI. Трансген, переносимый этими мышами, направляет экспрессию протоонкогена Her2/neu из стероидного рецептора у самок по большей части в (ER)-восприимчивый промотор MMTV. У 100% самок мышей MMTV-neu развиваются спонтанные карциномы молочных желез между 6 и 12-месячным возрастом.

Определение максимально переносимой дозы (MTD) кураксина-137, введенной мышам с их питьевой водой: группы мышей 5 MMTV-neu (самцы и самки в возрасте 4 недель) помещали в клетку и обеспечивали раствором кураксина-137 (разные концентрации, как описано ниже) в воде в темных бутылках (по меньшей мере 150 мл на бутылку) в качестве единственного источника воды. Бутылки взвешивали перед началом эксперимента и раз в неделю с этого времени. Бутылки наполняли раз в неделю. Мыши получали стандартное питание *ad libitum*. Мышей осматривали ежедневно по поводу изменений внешнего вида и поведения и взвешивали ежедневно в течение первой недели, а затем раз в неделю. Эксперимент длился в течение одного месяца или до достижения одного из следующих условий:  $\geq 10\%$  потеря в весе (все 5 мышей в группе);  $\geq 15\%$  потеря в весе у 2 и более животных в группе; стойкие изменения во внешнем виде и поведении мышей; гибель более одного животного в клетке. Стартовые дозы, тестируемые в этом эксперименте, подсчитывали, исходя из среднего суточного потребления жидкости мышами, составляющего 150 мл/кг/день, заимствованного из нескольких нормативных источников, а затем корректировали, исходя из фактического потребления жидкости в LAR, лаборатории RPCI.

Безопасность постоянного введения кураксина-137 при MTD и % MTD с питьевой водой: группы по 5 самок мышей MMTV-neu (в возрасте 4 недель) получали обыкновенную воду или растворы кураксина-137 (при MTD или % MTD) в воде *ad libitum* в течение 10 недель. Мышей взвешивали раз в неделю. Спустя 10 недель мышей глубоко анестезировали и собирали кровь путем пункции сердца для выделения плазмы. Основные органы собирали для гистопатологического анализа, выделения РНК и измерения концентрации кураксина-137.

Исследование предотвращения рака: неоплодотворенные самки мышей MMTV-neu (19-27 на группу) получали обычную воду или кураксин-137 в воде *ad libitum*. Обрабатываемые кураксином группы получали по 0,1 мг/мл кураксина-137, начиная с 4-недельного возраста, или по 0,2 мг/мл кураксина-137, начиная с 10-недельного возраста. Животных наблюдали ежедневно по поводу признаков патологических нарушений и появления опухолей. Их взвешивали раз в неделю в течение первых 24 недель, а затем раз в месяц. Животные, у которых развилась, по меньшей мере, одна видимая опухоль, переводили на безлекарственную воду и держали до тех пор, пока куммулятивный объем опухоли не достигал 2000 мм<sup>3</sup>. В это время мышей умерщвляли и иссекали все молочные железы, с опухолью или без, фиксировали в забуференном формалине и заключали в парафин для изготовления срезов. Гистопатологические исследования проводились вслепую квалифицированными патоморфологами в других лабораториях. Кроме того, H&E-окрашенные предметные стекла паренхимальных органов мышей, костного мозга и опухолей анализировали квалифицированные патоморфологи на месте (I.T.), а репрезентативные фотографии были сделаны с использованием инверсионного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 с масляными линзами N-achroplan 100×/1,25, камерой Zeiss MRC5 и программным обеспечением AxioVision Rel.4.8.

Было показано, что кураксин-137 можно вводить мышам постоянно с питьевой водой. Кураксин-137 является орально доступным и растворимым в воде. Для установления схемы постоянного введения для изучения предотвращения рака его исследовали на предмет того, могут ли мыши получать соединение с их питьевой водой. Мыши MMTV-*neu* не отказывались от питьевых растворов с 0,1 или 0,2 мг/мл кураксина-137, потребляя тот же объем жидкости за данный период времени, что и мыши, подверженные действию негативного контроля воды (фиг. 1А). Однако меньше жидкости потреблялось с более концентрированными растворами кураксина-137. Превращение количества раствора, потребленного мышами, в фактическую дозу лекарства указало на среднюю суточную дозу кураксина-137, составляющую  $13,8 \pm 2,2$  мг/кг для потребляющей 0,1 мг/мл раствора группы и  $28,5 \pm 2,5$  мг/кг для потребляющей 0,2 мг/мл группы (фиг. 1В). Мыши MMTV-*neu*, получающие растворы кураксина-137 при этих уровнях доз вместо привычной питьевой воды между 4 и 14-недельным возрастом, показали отсутствие отличий в приросте массы по сравнению с контрольными животными, получавшими негативный контроль воды (фиг. 1С). Кроме того, отсутствовали видимые отличия между группами мышей, получавшими кураксин, и контрольной группой в течение этого периода времени, за исключением того, что одна мышь характеризовалась сторбленностью в течение 2 дней без любых других изменений в поведении или весе. Не были обнаружены морфологические различия между исследуемыми группами во время гистопатологического исследования внутренних паренхиматозных органов к концу периода наблюдения (10 недель). Кроме того, иерархическая кластеризация глобальных генных профилей экспрессии генов в печени и селезенке (эти органы были выбраны в качестве органов с самым высоким уровнем накопленного кураксина-137, смотри ниже) показала небольшое отличие между получавшими кураксин и контрольными животными (фиг. 1Е). Данные указывают на то, что постоянное введение кураксина-137 не вызывает какой-либо очевидной системной токсичности.

Поскольку концентрации кураксина-137 в питьевой воде выше, чем 0,2 мг/кг, затрудняла потребление жидкости мышами, то эта доза (0,2 мг/мл кураксина-137 в питьевой воде; эквивалентна  $28,5$  мг/кг/день) была определена как MTD для этого режима введения. Эта доза была очень близка к ранее установленной относительной MTD для введения мышам через желудочный зонд ( $30$  мг/кг).

После введения 0,1 или 0,2 мг/мл кураксина-137 в питьевой воде в течение 10 недель, соединение было обнаружено в плазме мышей при средней концентрации 56,2 и 111,2 нг/мл соответственно (эквивалент 0,17 и 0,33 мкМ, дополнительная табл. 1). Значительно более высокие концентрации кураксина-137 были обнаружены в нескольких мышинных органах, показывая самые высокие уровни в селезенке (1286 и 2414 нг/мл в группах с низкой и высокой дозах соответственно (эквивалент 3,8 и 7,2 мкМ) (табл. 1).

Кураксин-137 в концентрациях, превышающих LC50% для большинства опухолевых клеток *in vitro* (0,2-0,6 мкМ), не вызывает никаких патологических изменений в селезенке или других проанализированных органах (фиг. 2). Таким образом, мы пришли к выводу, что постоянное введение кураксина-137 было достаточно безопасным, чтобы быть проверенным в качестве предупреждающего опухоль режима.

Кроме того, кураксин-137 задерживает появление опухоли и повышает выживаемость у трансгенных мышей MMTV-*neu*. Три группы самок трансгенных мышей MMTV-*neu* регулярно получали (i) воду на протяжении всей жизни ("необработанный" контроль), (ii) 0,1 мг/мл раствор кураксина-137 в воде с 4-недельного возраста, или (iii) 0,2 мг/мл кураксина-137 в воде с 10-недельного возраста (фиг. 1D). Несколько мышей в каждой группе (в том числе необработанной контрольной группе) умерло в ходе исследования не от опухолей. Причины, лежащие в основе этих смертей, не были установлены при аутопсии и гистологическом обследовании. Поэтому было сделано заключение о том, что эти смерти не связаны с образованием опухолей или введением препарата.

В контрольной группе, а также в группе, получавшей 0,1 мг/мл кураксина-137, маммарные опухоли стартовали, будучи обнаруженными в 23-25-недельном возрасте (фиг. 3А). В отличие от этого, появление опухолей было отложено до 40-недельного возраста в группе, получавшей 0,2 мг/мл кураксина-137. Несмотря на то, что кинетика первого появления опухоли в группе, получавшей низкую дозу кураксина, была такой же, как и в контрольной группе, группы с низкой и высокой дозой кураксина статистически отличались от контрольной группы на основе сравнения кривых безопухолевой выживаемости Каплана-Мейера с использованием логарифмического рангового критерия (фиг. 3В)

Средняя длительность безопухолевой выживаемости составляла 44 недели в контрольной группе и 57 и 78 недели в группах, получавших низкую и высокую дозу кураксина соответственно (фиг. 3В).

Общая выживаемость животных, получавших кураксин-137, была выше чем у контрольных животных в обеих группах (фиг. 5А). Некоторые животные в обеих группах, получавших кураксин, по-прежнему были без опухолей приблизительно на больше чем 15-месячном возрасте, в то время как контрольные животные жили не дольше чем 13 месяцев (фиг. 3В; табл. 2). Помимо родовой патологической оценки (фиг. 2), старших выживших животных из каждой группы подвергали "слепой" гистопатологической оценке с помощью независимой фенотипирующей лаборатории (табл. 2). Старшие животные, получавшие кураксин-137, не имели патологий, которые бы отличались от тех, которые наблюдались у старших выживших контрольных мышей (табл. 2). Это обеспечивает дополнительное подтверждение отсутствия общей токсичности и безопасности системного введения кураксина.

Пример 2: Антикарциногенные эффекты кураксинов.

Кураксин 137 (CBL0137) изучали с помощью мышей СВА, которым вводили 1,2-диметилгидразин (DMH) для оценки его способности ингибировать карциногенез. Этот карциноген вызывает опухоли в тканях толстой кишки, почек, матки, яичников, периаанальной коже, легких.

Способность DMH вызывать опухоли в толстой кишке у мышей и крыс известна из уровня техники. Сравнительную оценку карциногенной активности 1,2-DMH проводили с использованием разных пород мышей (табл. 3 и 4).

Наиболее эффективную карциногенную активность DMH проявил у мышей СВА. DMH индуцирует опухоли как у самцов, так и у самок мышей СВА, такие как, например, аденокарциномы и полипы толстой кишки, плоскоклеточные карциномы периаанально кожи, гепатомы и гемангиоэндотелиомы; опухоли. Примерные вызванные DMH опухоли у самок мышей СВА, как правило, включают, например, маточную саркому, аденокарциному яичников; примерные вызванные DMH опухоли у самцов мышей СВА, как правило, включают, например, ангиосаркому надпочечников и кистозные и солидные почечные аденомы. Таким образом, эта экспериментальная модель позволяет оценить кураксин против опухолей разных локализаций. Далее эта модель химически индуцированных опухолей переходит в заболелание человека прямо или опосредованно, так как 1,2-DMH и его несимметрический аналог, 1,1-DMH, являются канцерогенными для людей. Гидразин и его производные являются официально задекларированными человеческими онкогенами в законах России Федерации (Sanitation Regulation and Hygienic norms 1,2.2353-08 "Carcinogenic factors and main requirements to prevention of carcinogenic risk"). 1,1-DMH широко используется в аэрокосмической промышленности как важный компонент ракетного топлива. Тысячи людей вовлечены в его производство и использование, многие из них находятся в онкогенной группе высокого риска, так как имеют симптомы постоянного отравления 1,1-DMH. Многие карциногены, указанные как "абсолютные карциногены", могут не только инициировать образование опухоли, но также стимулировать и ее прогрессирование. 1,2-DMH является одним из таких карциногенов.

Без привязки к какой-либо теории, кураксины могут влиять на ферменты, задействованные в ксенобиотическом метаболизме, в частности кураксины могут влиять на ферменты, вовлеченные в ксенобиотический метаболизм, в частности изоформу CYP2E1 цитохрома P450, который необходим для метаболической активации 1,2-DMH. Соответственно кураксины могут влиять на инициирующий процесс и опухолестимулирующий процесс, вызванный 1,2-DMH.

Этот пример показывает антиопухолевые эффекты кураксинов во время одновременного введения с 1,2-DMH или после воздействия 1,2-DMH на животных.

Исследование включало 152 самца мышей и 150 самок мышей. Мышей разделили по следующим экспериментальным группам: 1) группа, в которой вводили 1,2-DMH, 2) группа, в которой вводили 1,2-DMH и кураксин, 3) группа, в которой вводили кураксин, 4) контрольная группа (без какого-либо введения).

Введения кураксина начали со 2 недели после прекращения введения 1,2-DMH, когда, без привязки к какой-либо теории, оба карциногена и их метаболиты были выведены из организма. Кураксин добавляли к питьевой воде в концентрации 0,20 мг/мл или 0,13 мг/мл, что отвечает дозам 30 и 20 мг/кг. Раствор кураксина готовили ежедневно.

Экспериментальные группы: самцы мышей СВА (152 мыши): 1) 30 мышей - контроль (без введения), 2) 37 мышей - 1,2-DMH, 15 недель, 8 мг/кг, 3) 44 мыши - 1,2-DMH, 15 недель, 8 мг/кг, CBL0137, 17-40 недель, 20 мг/кг, 4) 39 мышей - CBL0137, 17-40 недель, 20 мг/кг; самки мышей СВА (150 мышей): 1) 30 мышей - контроль (без введения), 2) 37 мышей - 1,2-DMH, 20 недель 8 мг/кг, 3) 44 мыши - 1,2-DMH, 20 недель, 8 мг/кг, CBL0137, 22-42 недели, 20 мг/кг, и 4) 39 мышей - CBL0137, 22-42 недели, 20 мг/кг.

План эксперимента показан на фиг. 4. Опухоли индуцировали 1,2-диметилгидразином. Кураксин 137 (CBL0137) вводили, как указано.

Оценка состояния животных в продолжение исследования

начиная с недели 1 исследования (введение DMH), мышей взвешивали и обследовали индивидуально несколько раз в неделю. Состояние мышей в течение введения лекарства обследовали по поводу изменений веса тела и двигательной активности животных. Умерших животных и агонирующих животных забирала умирать и на аутопсию в течение исследования. Количество введенного раствора кураксина оценили по оставшемуся количеству жидкости в поильных чашах на 1 клетку и рассчитывали как среднее для 1 животного.

Аутопсия и макроскопический анализ: мышей умертвили согласно усовершенствованному протоколу исследования животных. Во время аутопсии собрали образцы крови, провели патологоанатомический макроскопический анализ крови, произвели предварительную диагностику, взвесили органы. Органы были взяты (отдельно для заморозки и формалиновой фиксации) из 152 самцов мышей и 150 самок мышей. Органы животных, которые умерли во время исследования (если не наблюдалось разложение), зафиксировали в формалине.

Приготовление гистологических срезов осуществляли, как известно из уровня техники. После извлечения органы фиксировали в 10% забуференном формалине (Bio Vitrum) в течение не менее чем 3 дней. Затем образцы тканей дегидратировали спиртом (70°; 96° - 1, 96° - 2; 100° - 1, 100° - 2), хлорофор-

мом (ср., Vekton) и выливали в Histomix (Histomixextra, BioVitrum). Удаление парафина и окрашивание гистологических срезов: ксилол-1, ксилол-2 (м-ксилол, Merck); спирты (100°, 96°, 70°), гематоксилин-эозин (гематоксилин, Ferak; Eosin B, Aldrich). Обезвоживание и бальзамирование образцов: спирт (100°, 96°, 70°), ксилол-1, ксилол-2 (м-ксилол, Merck); среда для заливки Bio-Mount - аналог бальзама (Bio-Optica).

Вес тела животных: состояние повышения веса тела животных обследовалось во всех группах, начиная с недели 1 и по неделю 16. Некоторое повышение среднего веса тела наблюдалось во время введения DMH, начиная с недели 16 и по неделю 20. После введения кураксина в дозе 30 мг/кг всех животных обследовали по поводу энергичной потери веса тела и симптомов дегидратации. На 14 день у самцов мышей и на 7 день у самок мышей из-за появления дегидратации введение кураксина отменялось в течение 10 дней у самцов мышей и в течение 7 дней у самок мышей. Затем введение кураксина проводили в дозе 20 мг/кг до конца исследования; симптомы дегидратации не наблюдались (фиг. 5).

Данные некроскопии и макроскопического анализа веса органов: вес органов, извлеченных во время аутопсии, показан в табл. 5 и 6.

Данные макроскопического анализа органов животных, самцов и самок, в описанном исследовании показаны в табл. 7 и 8.

Опухоли толстой кишки: в контрольных группах самок и самцов мышей у животных, которым вводили кураксин, не наблюдалось опухолевых трансформаций. Опухоли толстой кишки были обнаружены в группах животных, получавших DMH: у 22 из 37 самцов мышей и у 20 из 39 самок мышей. Многообразие неоплазм в этих группах колебалось от 2 до 5 на животное. В группе DMH плюс кураксина опухоли были обнаружены у 12 из 44 самцов мышей и у 12 из 44 самок мышей.

Почечные опухоли: почечные опухоли были обнаружены у 22 самцов мышей в группах животных, которым вводили DMH, и у 18 из 45 самцов мышей в группе, которой вводили DMH плюс кураксин. В группе животных, которым вводили кураксин, и в контрольной группе не наблюдалось изменений в почках. Почечные опухоли у самок мышей наблюдались только в группе животных, получавших DMH, и только у 1 из 40 мышей.

Опухоли печени: самцы мышей СВА характеризуются высокой заболеваемостью спонтанными гепатомами. Введение DMH индуцирует значительное снижение в заболеваемости этим типом доброкачественной опухоли, однако, на сегодня его механизм не полностью ясен. Кураксин не имеет какого-либо влияния на интенсивность спонтанного карциногенеза у самцов мышей. У контрольных животных (30 самцов мышей) и в группе, получающей кураксин (40 самцов мышей), заболеваемость опухолью печени составило 17/30 (56,7%) и 22/39 (56,4%) соответственно. У самок мышей СВА спонтанные гепатомы развиваются более редко чем у самцов мышей. В группе DMH заболеваемость гепатомами составила 1/39, и в группе DMH плюс кураксин она составила 1/44. У самцов мышей, которым вводили DMH и DMH плюс кураксин, геморрагические неоплазмы печени развивались редко (1/37 и 1/44 соответственно). Таким образом, кураксин не обладал модулирующим действием на DMH-индукцию этого вида рака. Геморрагические неоплазмы в печени самок мышей развивались более часто (6/39 - группа DMH и 9/44 - группа DMH плюс кураксин).

Плоскоклеточные карциномы перианальной кожи: плоскоклеточные карциномы перианальной кожи (анальные опухоли - АТ) представляют собой плоскоклеточный рак, который развивается из поверхностного эпителия перианальной кожи. Некоторые из этих опухолей могут развиваться, без привязки к какой-либо теории, не только из поверхностного эпителия, но также из перианальных жировых (препуциальных) желез. DMH является индуктором АТ. Опухоли наблюдались у 16 из 37 самцов мышей и у 10 из 39 мышей. Введение кураксина не индуцировало образование этого вида опухолей и не имело влияния на карциногенную активность DMH (опухоли наблюдались у 18 из 44 самцов мышей и у 15 из 44 самок мышей).

Маточные опухоли: в контрольной группе и в группе мышей, которым вводили кураксин, маточные опухоли не были обнаружены. В группе DMH заболеваемость опухолью и утолщение рога и тела матки составило 19/39, а в группе DMH плюс кураксин эти же превращения наблюдались у 18 из 44 животных.

Опухоли яичников: максимальная заболеваемость прозрачными кистами была обнаружен у 9 из 30 мышей. В противоположность, кураксина группа показала 3 из 40 мышей, имеющих кисты. Следовательно, кураксин имел угнетающее действие на заболеваемость прозрачными кистами яичников. Подобный эффект наблюдался у животных, которым вводили DMH и DMH плюс кураксин (кисты наблюдались у 6 из 39 и 6 из 44 мышей соответственно). Геморрагические неоплазмы в яичниках по большей части наблюдались (6 из 39) в группе мышей, которым вводили DMH. В группе мышей, которым вводили DMH плюс кураксин, заболеваемость этими опухолями снизилась до 3 из 44. В группе мышей, которым вводили только кураксин, не наблюдались геморрагические неоплазмы в яичниках контрольной группы, этот вид опухоли был обнаружен у 1 из 30 мышей.

Опухоли других органов: у самцов мышей из группы DMH была обнаружена одна мезентериальная опухоль. У одной самки мышей, которой вводили DMH, были обнаружены одна маточная опухоль и желудочная опухоль метастатического происхождения.

Кроме того, микроскопический анализ обнаружил следующие доброкачественные и злокачествен-



ные опухоли и опухолевые массы.

Толстая кишка: glandулярные полипы и аденокарциномы были обнаружены у самок и самцов мышшей из группы DMH и группы DMH плюс кураксин.

Гистологический анализ толстой кишки у мышшей, которым вводили 1,2-DMH и DMH плюс кураксин, обнаружил развитие glandулярных полипов и аденокарцином у самок и самцов мышшей. У самцов мышшей, существенное антикарциногенное влияние кураксина проявлялось в заболеваемости полипами и аденокарциномами. В группе 1,2-DMH и группе 1,2-DMH плюс кураксин процент мышшей с полипами составил 54,05% и 22,73% соответственно. Эти отличия являются статистически значимыми ( $P < 0,01$ ) согласно критерию согласия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Во время макроскопического анализа многие животные обследовались по поводу наличия множественных glandулярных полипов. В этой связи подсчитывали количество полипов на животное с полипами (мультиплетность). Мультиплетность толстокишечных полипов, подсчитанная в группе DMH, была в 1,2 раза выше, чем в группе DMH плюс кураксин (1,80 и 1,50 соответственно).

У самок мышшей из группы DMH glandулярные полипы были обнаружены у 25 из 35 мышшей (64,10%) и в группе DMH плюс кураксин - у 11 из 44 (25,00%). Эти отличия являются статистически значимыми ( $P < 0,001$ ). У самок мышшей мультиплетность толстокишечных полипов, подсчитанная в группе DMH, превышает группу DMH плюс кураксин в 4 раза (6,12 и 1,64 соответственно).

Glandулярные полипы развиваются под воздействием 1,2-DMH и не являются спонтанными неоплазмами. В модели, использованной в этом исследовании, glandулярные полипы репрезентируют glandулярную эпителиальную гиперплазию толстой кишки, они демонстрируют экзофитный рост, не проникают в базальную мембрану и не повреждают мышечный слой.

Аденокарциномы толстой кишки у самцов мышшей были обнаружены только в группе DMH у 7 из 37 животных (18,92%). В группе DMH плюс кураксин эти опухоли не были обнаружены (0%). Это отличие является статистически значимым ( $P < 0,01$ ).

У самок мышшей аденокарциномы толстой кишки были обнаружены у 8 из 39 мышшей (20,51%) из группы DMH, что статистически выше по сравнению с контрольной группой. В группе DMH плюс кураксин аденокарциномы были обнаружены у 5 из 44 животных (11,36%). В группе DMH у одного животного наблюдалась злокачественность нескольких полипов (мультиплетность 1,50), а в группе DMH плюс кураксин этот феномен не наблюдался.

Аденокарцинома толстой кишки является злокачественным новообразованием glandулярного эпителия, которое характеризуется клеточной атипией и инвазивным ростом с проникновением в базальную мембрану и мышечный слой.

Почки: кроме того, у самцов мышшей значительный противоканцерогенный эффект проявлялся в снижении заболеваемости ангиосаркомами капсулы почки. Почечные аденомы были обнаружены в почках самок и самцов мышшей из группы DMH и группы DMH плюс кураксин. Самцов мышшей также обследовали по поводу наличия ангиосарком почечной капсулы. У самцов мышшей из группы DMH почечные аденомы были обнаружены у 94,6% (у 35 из 37 животных), а в группе DMH плюс кураксин - у 38 из 44 животных (86,4%). Во время микроскопического анализа многие животные были обследованы по поводу наличия тяжелых почечных аденом. Мультиплетность почечных аденом в группе DMH была в 1,5 раза выше, чем в группе DMH плюс кураксин (3,84 и 2,55 соответственно).

У самок мышшей из группы DMH почечные аденомы наблюдались у 3 из 39 (7,69%) мышшей, а в группе DMH плюс кураксин - у 1 из 44 животных (2,27%).

По гистологической структуре почечные аденомы делятся на кистоаденомы, папиллярные кистоаденомы и солидные аденомы. Митоз в этих опухолях очень редок, клеточная атипия не тяжелая, инвазивный рост в периферические ткани отсутствует.

Ангиосаркомы капсулы почки (RCA) были обнаружены только у самцов мышшей. В группе DMH RCA были обнаружены у 18 из 37 животных (48,65%) и в группе DMH плюс кураксин RCA были обнаружены только у 9 из 44 (20,45%). Эти отличия являются статистически значимыми ( $P < 0,01$ ).

Гистологически на ранних стадиях развития ангиосаркомы капсулы почки мы обнаружили субкапсулярные кровоизлияния с артериальным тромбозом и капиллярным ростом почечную капсулу. Большие опухоли репрезентируют разные гистологические варианты ангиосаркомы. У животных не были обнаружены метастазы.

Печень: образование спонтанных доброкачественных печеночных опухолей - гепатом - является обычным явлением для мышшей СВА. Гепатомы были обнаружены у животных из всех экспериментальных и контрольных групп, как у самок, так и у самцов. Гепатомы были обнаружены у 11 из 37 (29,73%) самцов мышшей из группы DMH, у 10 из 44 (22,73%) мышшей из группы DMH плюс кураксин, у 22 из 39 мышшей (56,41%) из кураксиновой группы, и у 16 из 30 (53,33%) мышшей из контрольной группы. Заболеваемость спонтанными гепатомами в группе, которой вводили DMH, была ниже, чем в кураксиновой группе и контрольной группе. Однако в группе DMH наблюдались многочисленные гепатомы (1,55 мультиплетность), которые не наблюдались в других группах. В группе DMH - 2 из 39 (5,13%) имели гепатомы, в группе DMH плюс кураксин - 2 из 44 (4,55%), в кураксиновой группе - 1 из 39 (2,56%), в контрольной группе - 1 из 30 (3,33%).

Гистологически гепатома представляет собой узелок, четко отличающийся от нетрансформированной печеночной ткани. Гепатома характеризуется повреждениями структуры печени, отсутствием лучевой структуры, типичной для печени, гепатоциты значительно отклоняются от нормы, клеточной дистрофией и некрозом.

Перианальная кожа: опухоли перианальной кожи являются одними из наиболее часто встречаемых неоплазм, вызванных ДМН у мышей. Опухоли перианальной кожи (анальные опухоли - АТ) представляют собой плоскоклеточный рак, который развивается из поверхностного эпителия перианальной кожи. Некоторые из таких опухолей могут развиваться не только из поверхностного эпителия, но и также из перианальных жировых (препуциальных) желез.

В группе ДМН АТ была обнаружена у 16 из 37 самцов мышей (43,24%), в группе ДМН плюс кураксин - у 18 из 44 животных (40,91%).

У самок мышей, в группе ДМН АТ была обнаружена у 11 из 38 животных (28,21%), а в группе ДМН плюс кураксин - у 15 из 44 животных (34,09%).

Микроскопический анализ обнаружил гистологические типы опухолей перианальной кожи, описанных ниже. Наиболее часто наблюдаемым раком является плоскоклеточный рак с ороговением или без ороговения. Плоскоклеточный рак с ороговением является более дифференцированным типом рака, чем рак кожи без ороговения. Рак препуциальных желез был диагностирован только у двух животных (1 самки мышей и 1 самца мышей) в группе ДМН, и мышинной самки эта опухоль метастазировала в легкие. Повышение плоскоклеточного рака с ороговением наблюдалось в группе ДМН плюс кураксин по сравнению с группой ДМН. Таким образом, 7 из 37 самцов мышей имели плоскоклеточный рак с ороговением (18,92%) в группе ДМН и 16 из 44 (36,36%) самцов мышей в группе ДМН плюс кураксин. Плоскоклеточный рак без ороговения был обнаружен у 8 из 37 животных (21,62%) в группе ДМН и только у 2 из 44 (4,55%) животных в группе ДМН плюс кураксин. У самок мышей плоскоклеточный рак с ороговением был обнаружен у 3 из 39 мышей (7,69%) в группе ДМН и у 11 из 44 (25,00%) в группе ДМН плюс кураксин. Плоскоклеточный рак без ороговения был обнаружен у 7 из 39 мышей (17,94%) в группе ДМН и у 4 из 44 (9,09%) в группе ДМН плюс кураксин.

Матка: спонтанные маточные саркомы у мышей СВА развиваются очень редко и только у мышей старше 18 месяцев. После введения ДМН маточные саркомы наблюдаются у 50% мышей, независимо от дозы и режима. Численность маточных сарком в группе ДМН была в 1,4 выше, чем в группе ДМН плюс кураксин. В группе ДМН маточные саркомы были обнаружены у 13 из 39 животных (33,33%), а в группе ДМН плюс кураксин у 9 из 44 животных (20,45%). Одна самка из группы ДМН была обследована по поводу маточной саркомы с метастазами в брюшную стенку. Гистологически эти опухоли определены как стромальные саркомы, которые развиваются в эндометриальной строме с миометриальной инвазией. Опухолевая ткань состояла из удлиненных клеток фибробластного типа и областей с незрелыми мезенхимальными клетками. Метастазы брюшной полости выглядели подобными неоплазмам, выпяченными в полость, а микроскопически они имели структуру фибробластной саркомы.

Яичники: у самок мышей СВА фолликулярные овариальные кисты развиваются спонтанно, что связано с ускоренным старением этих животных. Максимальная заболеваемость прозрачными кистами наблюдалась в контрольной группе (17 из 39 мышей (56,67%)); в группе ДМН фолликулярные кисты развились у 11 из 39 мышей (28,31%), в группе ДМН плюс кураксин фолликулярные кисты развились у 9 из 44 (20,45%) мышей; в кураксиновой группе фолликулярные кисты развились у 15 из 39 мышей (38,46%). Таким образом, ДМН достоверно снижает количество фолликулярных кист, в то время как кураксин интенсифицирует его действие.

Кроме фолликулярных кист самки мышей из экспериментальных и контрольных групп испытывали повреждения, вызванные геморрагическими кистами и гемангиомами. Геморрагические кисты развились во всех группах, за исключением кураксиновой группы. В группе ДМН геморрагические кисты были обнаружены у 3 из 39 мышей (7,69%), в группе ДМН плюс кураксин геморрагические кисты были обнаружены у 5 из 44 (11,36%), а в контрольной группе геморрагические кисты были обнаружены у 4 из 30 (13,33%). Гемангиомы наблюдались только в группе ДМН (у 5 самок мышей из 39 - 12,82%) и в группе ДМН плюс кураксин (у 1 самок мышей из 44 - 2,27%). Тем не менее, количество гемангиом в группе ДМН превышало их количество в группе ДМН плюс кураксин в 5 раз.

Легкие: в легких были обнаружены доброкачественные неоплазмы, эти аденомы, которые являются спонтанными у линейных мышей, развиваются довольно редко у мышей СВА. У самцов мышей, ДМН индуцировал спонтанный аденомогенезис в легких, а кураксин не действовал на него. В группе ДМН аденомы наблюдались у 7 из 27 животных (18,92%,  $P < 0,05$  по сравнению с контролем), в группе ДМН плюс кураксин - у 7 из 44 (15,91%,  $P > 0,05$ , по сравнению с контролем), в контрольной группе - у 1 из 30 (3,33%) мышей. В кураксиновой группе легочные аденомы не были обнаружены. У самок мышей из группы ДМН аденомы наблюдались у 3 из 39 животных (7,69%), в группе ДМН плюс кураксин аденомы наблюдались у 2 из 44 (4,55%), а в кураксиновой группе аденомы наблюдались у 1 из 39 животных (7,69%). В контрольной группе аденомы не были обнаружены.

Селезенка: микроскопический анализ селезенки проводили у всех самок и самцов мышей. Не было обнаружено патологических изменений в этом органе.

Таким образом, этот эксперимент показал, *inter alia*, что кураксин имели антикарциногенный эффект после индукции опухолей толстой кишки 1,2-диметилгидразином: коэффициент заболеваемости аденоматозными полипами снизился у самцов мышей с 54,05% до 22,73%, у самок мышей с 64,4% до 25% и потом коэффициент заболеваемости аденокарциномами у самцов мышей снизился с 18,9% до 0%, у самок мышей с 20,51% до 11,3%. Далее, этот эксперимент показал, *inter alia*, что кураксин индуцировал снижение мультиплетности в образовании аденоматозных полипов у самцов мышей - в 1,2 раз, у самок мышей - в 4 раза. Кроме того, этот эксперимент показал, *inter alia*, что кураксин снизил коэффициент заболеваемости ангиосаркомами почечной капсулы у самцов мышей с 48,65% до 20,45%. Более того, этот эксперимент показал, *inter alia*, что введение кураксина снизило коэффициент заболеваемости маточными саркомами, индуцированными DMH, с 33,33% до 20,45%. Дополнительно, этот эксперимент показал, *inter alia*, что кураксин не обладают прокарциногенным действием.

#### Эквиваленты

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, или они будут способны установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, в частности, описанные в данном документе. Такие эквиваленты охватываются объемом приложенной формулы изобретения.

#### Включение путем ссылок

Все патенты и публикации, на которые ссылаются в данном документе, включены в него посредством ссылки во всей их полноте.

Таблица 1

Концентрация кураксина -137 в питьевой воде	0,1 мг/мл	0,2 мг/мл
плазма	0,17+/- 0,09	0,33+/-0,09
печень	0,96+/-0,55	1,65+/-0,5
почки	0,67+/-0,28	1,74+/-0,33
селезенка	3,8+/-0,86	7,2+/-0,97

Таблица 2. Гистопатологические особенности у старых мышей в каждой обработанной группе (две мыши на группу)

мышь (группа)	контроль	контроль	кураксин-137, 0,1 мг/мл	кураксин-137, 0,1 мг/мл	кураксин-137, 0,2 мг/мл	кураксин-137, 0,2 мг/мл
возраст на момент эксперимента	8,5 месяцев	8,5 месяцев	16,5 месяцев	19 месяцев	17 месяцев	16 месяцев
маммарные железы	аденокарцинома	множественная аденокарцинома	аденокарцинома	дилатационная маммарная доля	аденокарцинома	аденокарцинома
печень	нету отличий между контролем и обработанными мышами					
селезенка	легкая лимфоидная гиперплазия	умеренная лимфоидная гиперплазия	легкая лимфоидная гиперплазия	умеренная лимфоидная гиперплазия	легкая лимфоидная гиперплазия	легкая лимфоидная гиперплазия
легкие	легкие мультифокальные перифронхальные лимфоидные ольрные лимфоидные инфильтраты	легкие мультифокальные перифронхальные лимфоидные инфильтраты и умеренные периваскулярные лимфоидные инфильтраты	легочные метастазы аденокарциномы молочной железы	легкие мультифокальные перифронхальные лимфоидные инфильтраты	метастатическая аденокарцинома	метастатическая аденокарцинома
почки	нет существенных изменений	нет существенных изменений	фокальные периваскулярные лимфоцитные и макрофаговые инфильтраты	фокальные периваскулярные лимфоцитные и макрофаговые инфильтраты	нет существенных изменений	нет существенных изменений

Таблица 3

вид	опухоли					
	процент мышей с опухолями	опухоли толстой кишки (%)	аденома перианальных подкожных желез (%)	саркома матки (%)	опухоли яичников (%)	опухоли печени (%)
C3H	94	75	50	37,5	6	6
СВА	96,3	70,4	59,2	40,7	3,7	18,4
F1 (CBAxС57В1/6)	93,1	79,3	24,1	20,7	17,2	37,9
С57В1/6	75,7	59,4	24,3	2,7	35,1	5,4
BALB/c	96,6	93,3	63,3	-	46,7	23,3
DBA/2	70,4	55,5	25,9	-	62,9	22,2
С3НА	76,2	30,9	59,5	-	85,7	14,3
AKR	79,5	53,8	38,5	7,7	10,2	20,5

Таблица 4

вид	опухоли	процент мышей с опухолями	ангиосаркомы печени (%)	аденомы почек (%)	опухоли толстой кишки (%)	гемангиомы печени (%)	гепатомы	аденома периаанальных подкожных желез (%)	опухоли легких
СЗН		31	35	13	3	13	16	13	0
СВА		33	97	79	33	15	64	18	0
F1 (СВАхС57В1)		47	36	30	54	9	47	21	0
С57В/6		47	4	23	74	0	0	32	0
BALB/c		23	13	43	26	9	4	48	26
СЗНА		28	7	14	4	0	11	14	0

Таблица 5. Сводная таблица веса органов, извлеченных во время аутопсии из самок мышей

Группа		средний вес мышши, г	средний вес органа, г															
			легкие		сердце		селезенка		поджелудочная железа		почка+надпочечные железы		печень		тимус		матка+яичники	
			abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %
Контроль	Среднее	31,73	0,25	0,79	0,11	0,35	0,09	0,29	0,08	0,24	0,38	1,19	1,35	4,28	0,04	0,13	0,39	1,24
	SEM	0,6235	0,0075	0,0249	0,0021	0,0095	0,0026	0,0129	0,0040	0,0138	0,0069	0,0259	0,0244	0,0708	0,0017	0,0054	0,0239	0,0910
CBL0137	Среднее	31,10	0,26	0,86	0,11	0,37	0,10	0,32	0,07	0,24	0,35	1,15	1,39	4,51	0,04	0,12	0,40	1,31
	SEM	0,5978	0,0081	0,0304	0,0014	0,0079	0,00565	0,0204	0,0035	0,0119	0,0058	0,0289	0,0285	0,1041	0,0015	0,0051	0,0541	0,1975
1,2-DMH	Среднее	27,04	0,22	0,81	0,12	0,44	0,14	0,57	0,08	0,30	0,36	1,33	1,24	4,61	0,03	0,12	0,77	2,95
	SEM	0,5816	0,0067	0,0256	0,0044	0,0197	0,0152	0,0721	0,0045	0,0163	0,0080	0,0379	0,0501	0,2065	0,0022	0,0102	0,1579	0,6519
1,2-DMH + CBL0137	Среднее	26,50	0,19	0,75	0,10	0,41	0,13	0,54	0,09	0,34	0,34	1,34	1,07	4,70	0,03	0,14	0,64	2,51
	SEM	0,8207	0,0068	0,0256	0,0037	0,0131	0,0074	0,442	0,0048	0,0233	0,0090	0,0476	0,0978	0,0895	0,0026	0,0111	0,0921	0,4066

Таблица 6. Сводная таблица веса органов, извлеченных во время аутопсии у самцов мышей

Группа		средний вес мышши, г	средний вес органа															
			легкие		сердце		селезенка		поджелудочная железа		почка+надпочечные железы		печень		тимус			
			abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %	abs, г	rel, %		
Контроль	Среднее	38,38	0,33	0,85	0,15	0,4	0,1	0,25	0,08	0,2	0,68	1,77	2,05	5,37	0,04	0,11		
	SEM	0,4663	0,0156	0,0401	0,0025	0,0065	0,067	0,0151	0,0039	0,01	0,0096	0,0215	0,0747	0,14895	0,0021	0,0054		
CBL0137	Среднее	36,00	0,37	1,04	0,15	0,41	0,09	0,26	0,07	0,21	0,64	1,79	1,95	5,41	0,05	0,13		
	SEM	0,5358	0,0182	0,0499	0,0023	0,007	0,0024	0,0062	0,0041	0,0108	0,0117	0,0286	0,0675	0,152	0,0026	0,0082		
1,2-DMH	Среднее	30,87	0,28	0,94	0,14	0,44	0,11	0,36	0,09	0,29	0,61	1,94	1,48	4,81	0,03	0,11		
	SEM	0,4929	0,0106	0,0452	0,0036	0,0091	0,0059	0,0221	0,0034	0,0098	0,0204	0,0596	0,0417	0,1244	0,0026	0,0074		
1,2-DMH-CBL0137	Среднее	29,64	0,31	1,07	0,14	0,48	0,14	0,49	0,12	0,34	0,58	1,84	1,37	4,69	0,03	0,12		
	SEM	0,583	0,0148	0,073	0,0028	0,0131	0,0094	0,0413	0,0213	0,0146	0,0356	0,0559	0,0352	0,1275	0,002	0,0064		

Таблица 7. Макроскопические изменения в органах самок мышей

Группа	количество животных	опухоли толстой кишки	маточные опухоли	опухоли периаанальной кожи	яичники**		печень***			опухоли почек	другие опухоли
					геморрагические неоплазмы	прозрачные кисты	геморрагические неоплазмы	из тканей печени			
DMH	39	20 (51,3%)	10 (25,6%)	19 (48,7%)	6 (15,4%)	6 (15,4%)	6 (15,4%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	1 (2,6%)	
DMH+CBL0137	44	12 (27,3%)	15 (34,1%)	18 (40,9%)	3 (6,8%)	5 (11,4%)	9 (20,5%)	1 (2,3%)	-	-	
CBL0137	40	-	-	-	-	3 (7,7%)	-	-	-	-	
Контроль	30	-	-	-	1 (3,3%)	9 (30%)	-	-	-	-	

\* - неоплазмы толстой кишки

\*\* - геморрагические и прозрачные кисты яичников

\*\*\*- очаговые геморрагические изменения в печени и узелках печеночной ткани

' - возможны метастазы в брюшную стенку

Таблица 8. Макроскопические изменения в органах самцов мышей

Группа	количество животных	толстая кишка*	опухоли перианальной кожи	почечные опухоли	печень**		другие органы
					геморрагические	из ткани печени	
DMH	37	22 <sup>б</sup> (59,9%)	16(43%)	22(59,5%)	1(2,7%)	12(32,4%)	1 <sup>а</sup> (2,6%)
DMH+СВL0137	44	12(27,3%)	18(41%)	18(38,6%)	1(2,3%)	13(29,5%)	-
СВL0137	39	-	-	-	-	22(56,4%)	-
Контроль	30	-	-	-	-	17(56,7%)	-

\* - полипы толстой кишки

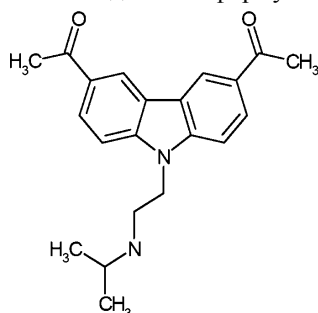
\*\* - фокальные геморрагические трансформации печени и узла ткани печени

а - геморрагические неоплазмы в брыжейке

б - в группе DMH 50% животных было обследовано на наличие множественных полипов (от 3 до 6 на животное) по сравнению с группой DMH +СВL0137

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ предотвращения вызванного канцерогеном рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества соединения формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат; причем канцероген представляет собой генотоксический канцероген, и рак представляет собой рак толстой кишки, рак почки или рак матки.

2. Способ по п.1, где рак представляет собой рак толстой кишки.

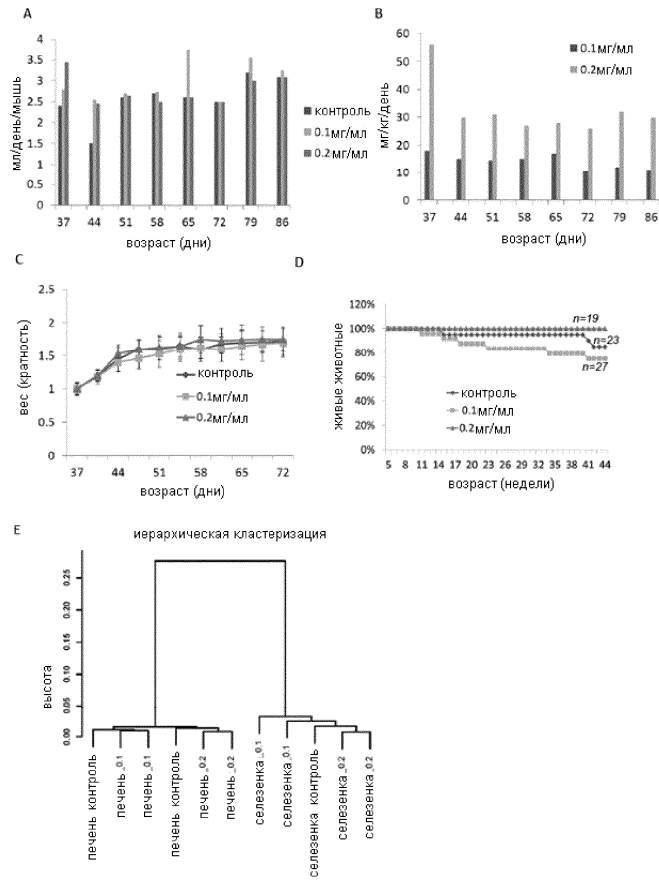
3. Способ по п.1, где рак представляет собой рак почки.

4. Способ по п.1, где рак представляет собой рак матки.

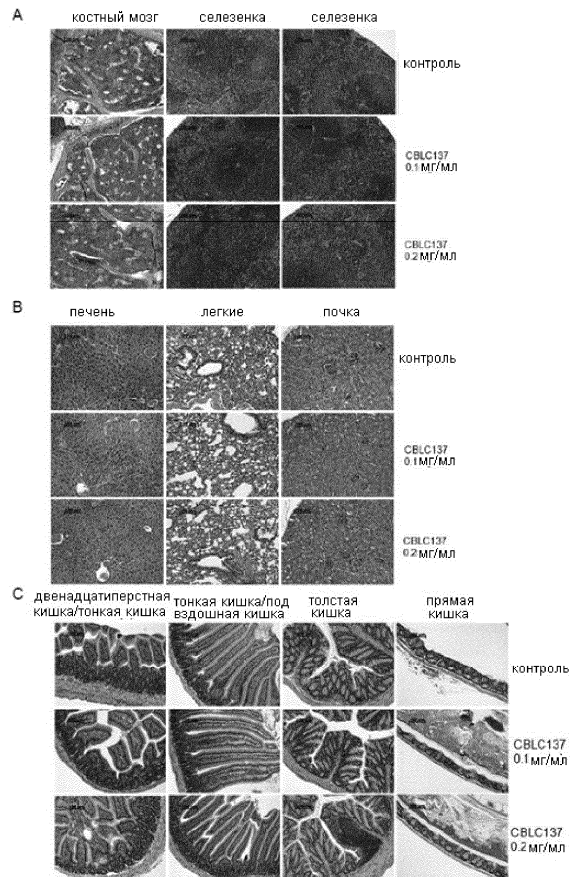
5. Способ по п.1, где генотоксический канцероген представляет собой гидразин.

6. Способ по п.5, где гидразин представляет собой диметилгидразин.

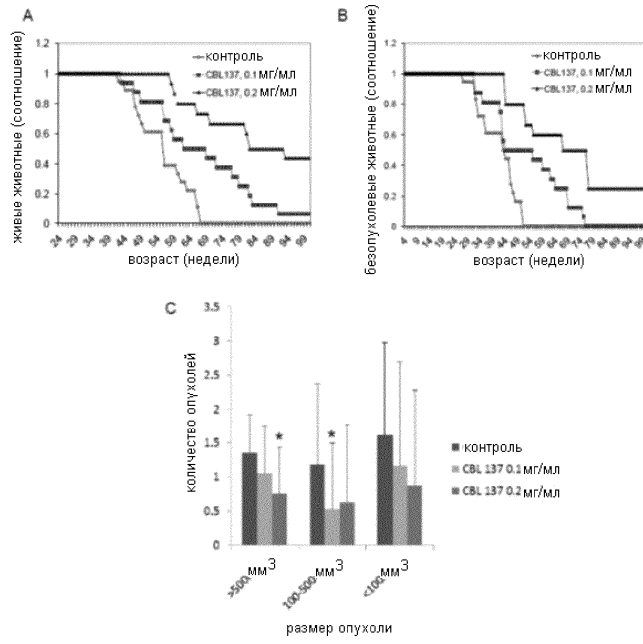
7. Способ по п.6, где диметилгидразин представляет собой 1,2-диметилгидразин.



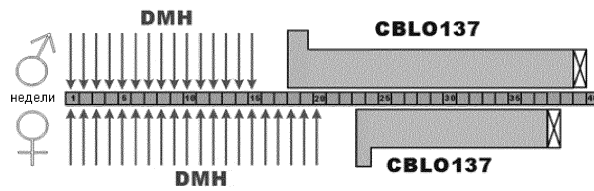
Фиг. 1



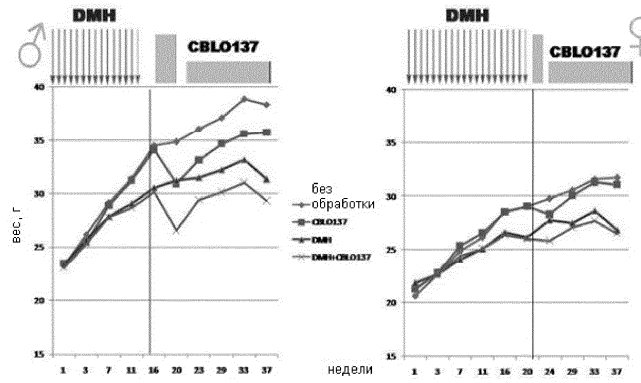
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

