

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **032463**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.05.31

(21) Номер заявки
201490798

(22) Дата подачи заявки
2012.10.19

(51) Int. Cl. *A61K 31/52* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗЫ БРУТОНА (ВТК)

(31) **61/549,067**

(32) **2011.10.19**

(33) **US**

(43) **2015.02.27**

(86) **PCT/US2012/061208**

(87) **WO 2013/059738 2013.04.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФАРМАСАЙКЛИКС ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
**Багги Джозеф Дж., Элиас Лоренс, Фи
Гвен, Хедрик Эрик, Лаури Дэвид Дж.,
Моди Тарак Д. (US)**

(74) Представитель:
**Дементьев В.Н., Клюкин В.А.,
Христофоров А.А., Угрюмов
В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва А.О.,
Гизатуллина Е.М., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2011112623**

CA-A1-2847852

**GHOBRIAL Irene M. et al. Expression of
the Chemokine Receptors CXCR4 and CCR7 and
Disease Progression in B-Cell Chronic Lymphocytic
Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. Mayo Clin
Proc., 2004; 79: pp. 318-325, особенно, реферат,
табл. 1, 3, 4**

**HONIGBERG Lee A. et al. The Bruton
tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell
activation and is efficacious in models of autoimmune
disease and B-cell malignancy. PNAS, 2010, vol. 107,
no. 29, pp. 13075-13080**

(57) Описана комбинация: а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и b) GA 101; в которой необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм. Также описано применение указанной комбинации для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

B1**032463****032463****B1**

Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/549067, озаглавленной "Применение ингибиторов тирозинкиназы Брутона (ВТК)", и поданной 19 октября 2011 г.; содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки в полном объеме.

Сведения о предшествующем уровне техники

Тирозинкиназа Брутона (Btk), член семейства нерецепторных тирозинкиназ Тес, представляет собой ключевой фермент сигнальных каскадов, экспрессирующийся во всех типах гематопозитических клеток, кроме Т-лимфоцитов и клеток - натуральных киллеров. Btk играет важную роль в сигнальных каскадах В-клеток, связывая стимуляцию рецептора В-клеток (BCR) клеточной поверхности с надлежащими («downstream») внутриклеточными реакциями.

Btk является ключевым регулятором развития, активации, передачи сигналов и выживания В-клеток (Kurosaki, *Curr Opin Immunol*, 2000, 276-281; Schaeffer and Schwartzberg, *Curr Opin Immunol* 2000, 282-288). Кроме того, Btk играет некоторую роль в ряде других сигнальных каскадов гематопозитических клеток, например, образовании TNF- α в макрофагах, опосредуемом Toll-подобным рецептором (TLR) и рецепторами цитокинов, сигнальном каскаде IgE рецептора (Fc ϵ RI) тучных клеток, ингибировании сигнала апоптоза Fas/APO-1 у лимфоидных В-клеток и агрегации тромбоцитов, инициируемой коллагеном. См. например, C. A. Jeffries et al., (2003), *Journal of Biological Chemistry* 278:26258-26264; N. J. Horwood, et al., (2003), *The Journal of Experimental Medicine* 197:1603-1611; Iwaki et al. (2005), *Journal of Biological Chemistry* 280(48):40261-40270; Vassilev et al. (1999), *Journal of Biological Chemistry* 274(3): 1646-1656, and Quek et al. (1998), *Current Biology* 8(20): 1137-1140.

Сущность изобретения

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта комбинация:

А) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб) и

б) GA 101;

в которой необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз, лимфопролиферативное заболевание или миелоидное заболевание. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой: ZAP70; t(14,18); β -2-микроглобулин; мутационный статус p53; мутационный статус ATM; del(17)p; del(11)q; del(6)q; CD5; CD11c; CD19; CD20; CD22; CD25; CD38; CD103; CD138; экспрессию секретируемого поверхностного или цитоплазматического иммуноглобулина; мутационный статус V_H; или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), CLL высокого риска или не-CLL/SLL лимфому. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или фолликулярную лимфому (FL). В некоторых вариантах осуществления необратимый ингибитор Btk ковалентно связан с Cys-481 Btk. В некоторых вариантах осуществления необратимый ингибитор Btk представляет собой В некоторых вариантах осуществления абсолютное число лимфоцитов в периферической крови субъекта повышается по меньшей мере примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125 150, 175 или 200% после введения необратимого ингибитора Btk субъекту. В некоторых вариантах осуществления абсолютное число лимфоцитов в периферической крови субъекта повышается по меньшей мере примерно на 10-50% после введения необратимого ингибитора Btk субъекту. В некоторых вариантах осуществления мобилизованные клетки имеют пониженную экспрессию CD38 и CXCR4. В некоторых вариантах осуществления мобилизованные клетки представляют собой CD19+CD5+ клетки.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение комбинации:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101;

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм,

для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль, хронический лимфоцитар-

ный лейкоз (CLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или фолликулярную лимфому (FL).

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение комбинации:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101;

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм,

для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, где GA 101 вводят субъекту, когда субъект идентифицирован как имеющий увеличенную мобилизацию множества клеток из злокачественной опухоли после введения необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем идентификация увеличения мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли основана на детекции присутствия, экспрессии или уровня экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CXCR4, Ki67, MDC, MIP-1 β , CXCL-13, CXCL17, IL-10, MIP-1 α , CCL17 и CCL21.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана роль активности Btk в ряде процессов в клетке хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), которые вносят вклад в патогенез заболевания.

На фиг. 2 показан ответ лимфатического узла (LN) у пациента, страдающего CLL. Слева показан LN до терапии необратимым ингибитором Btk (PCI-32765) и справа показан LN после терапии необратимым ингибитором Btk (PCI-32765).

На фиг. 3 показано процентное изменение опухолевой массы на протяжении курса терапии в клиническом исследовании, включающем введение необратимого ингибитора Btk (PCI-32765) пациентам с рецидивирующими рефрактерными (R/R) CLL/SLL при дозе 420 мг/сутки или 840 мг/сутки.

На фиг. 4 представлено абсолютное число лимфоцитов (ALC) и сумма произведений диаметров (SPD) лимфатических узлов (LN) во время курса лечения необратимым ингибитором Btk (PCI-32765) пациентов, ранее не получавших лекарственной терапии (treatment naïve) (пунктирная линия) или имеющих R/R CLL/SLL (жирная линия), которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765.

На фиг. 5 представлен наилучший суммарный ответ у пациентов, ранее не получавших лекарственной терапии, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения. CR = полный ответ. PR = частичный ответ.

На фиг. 6 представлен наилучший суммарный ответ у пациентов с R/R CLL/SLL, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения. CR = полный ответ. PR = частичный ответ.

На фиг. 7 представлено сравнение между наилучшим суммарным ответом у пациентов с R/R CLL/SLL (RR) и у пациентов, не получавших ранее лекарственной терапии (TN), которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения. CR = полный ответ. PR = частичный ответ.

На фиг. 8 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109 L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам с фолликулярной лимфомой, которые достигли полного или частичного ответа (CR/PR). По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени, соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Всех пациентов (за исключением Pt 32009) обрабатывали по схеме, состоящей из 4 недель терапии с последующей одной неделей отсутствия терапии. Таким образом, после дня 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этих пациентов. Отмечаются повышения ALC во время большинства циклов у большинства пациентов и падение ALC в начале последующих циклов. Эта картина часто является смазанной на поздних циклах, так как пациенты отвечали на лечение. Пациент 32009 получал лечение без прерывания и не показал эту циклическую картину, но показал повышение в Цикле 1, на день 15, и постепенные повышения во время Циклов с 2 по 5.

На фиг. 9 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109 L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам с фолликулярной лимфомой, которые имели стабильное течение заболевания (SD) во время лечения. По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени, соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Всех пациентов обрабатывали по схеме, состоящей из 4 недель лечения с последующей одной неделей отсутствия лечения. Таким образом, за днем 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этих пациентов. Отмечается постепенное повышение мобилизации ALC в крови у пациента 32004, который изначально был стабильным, но позже имел прогрессирующее развитие заболевания (PD).

На фиг. 10 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам с фолликулярной лимфомой, имеющим Прогрессирующее течение заболевания (PD). По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени,

соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Все пациенты, за исключением 38010, получали лечение по схеме, состоящей из 4 недель лечения с последующей одной неделей отсутствия лечения. Таким образом, за днем 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этих пациентов. Отмечается отсутствие мобилизации, особенно для пациентов 38010 и 32001. Пациент 323001 имел ограниченную терапию перед прекращением участия в исследовании. Ответ лимфоцитов предполагает, что этот пациент мог иметь ответ в случае возможности остаться на лечении дольше.

На фиг. 11 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам, имеющим DLBCL с прогрессирующим течением заболевания (PR) и со стабильным течением заболевания (SD). По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени, соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Пациент 38011 получал лечение по схеме, состоящей из 4 недель лечения с последующей одной неделей отсутствия лечения. Таким образом, за днем 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этого пациента. Пациенты 38008 и 324001 получали лечение в виде непрерывных ежедневных доз.

На фиг. 12 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам, имеющим DLBCL с прогрессирующим течением заболевания (PD). По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени, соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Пациенты получали лечение по схеме, состоящей из 4 недель лечения с последующей одной неделей отсутствия лечения. Таким образом, за днем 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этих пациентов. Отмечается отсутствие мобилизации для 3 из 4 пациентов. Пациент 32002 получил только один цикл терапии.

На фиг. 13 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам с лимфомой из клеток мантийной зоны. По оси Y показано абсолютное число лимфоцитов (ALC) в каждый момент времени, соответствующий номеру цикла и дню на оси X. Пациенты 32006, 38003 и 38004 получали лечение по схеме, состоящей из 4 недель лечения с последующей одной неделей отсутствия лечения. Таким образом, за днем 1 каждого цикла следовала одна неделя отсутствия приема лекарственного средства для этих пациентов. Отмечается, что пациент с начальным PD (32014) не показал мобилизации.

На фиг. 14 показано абсолютное число лимфоцитов (ALC)/109L в зависимости от Дня цикла после введения ингибитора Btk субъектам с лимфомой из клеток мантийной зоны, показанной на фиг. 12. Ось была изменена по сравнению с фиг. 12 для демонстрации малых амплитудных флуктуаций. Отмечается, что все отвечающие пациенты показали некоторую степень мобилизации.

На фиг. 15 показано, что мобилизация лимфоцитов, в особенности В-клеточного типа, согласующаяся с клетками лимфомы, понижается, так как заболевание отвечает. Пациент 32007, Когорта 4, имел фолликулярную лимфому, степень 3, которая постепенно регрессировала от SD до CR. Хотя изменения ALC в этом случае не являются существенными, фракция В-клеток претерпевает характерные циклические повышения в ответ на терапию ингибитором Btk. Также отмечается поцикловое уменьшение магнитуды сдвигов, согласующееся с кумулятивным контролем заболевания.

На фиг. 16 показано, что имеется повышенная мобилизация В-клеток с прогрессированием заболевания. Пациент 32004, Когорта 2, имел фолликулярную лимфому, степень 1, которая прогрессировала от начального SD до PD после Цикла 6.

На фиг. 17 показана ранняя мобилизация и возможное уменьшение субпопуляции В-клеток CD45^{DIM} у отвечающего пациента 200-005 с лимфомой из клеток мантийной зоны. Эта субпопуляция имеет характерный для MCL иммунофенотип (CD45^{DIM}) и отличается от иммунофенотипа нормальных лимфоцитов.

На фиг. 18 показана аномальная мобилизация CD19⁺ клеток и затем регрессирование у пациента Pt 324001, имеющего CR DLBCL. Эти клетки CD45⁺ с боковым рассеянием света (SSC-H), показанные в верхней части, давали сигнал и их CD3 vs CD19 окрашивание показано в нижней части. Здесь гипотетические злокачественные клетки были "спрятаны" в большом окне мононуклеарных клеток (MNC), обычно определяющем моноциты. Последовательность мобилизации с последующим ответом сходна с другими примерами.

На фиг. 19 представлен наилучший суммарный ответ у пациентов с R/R MCL, которым вводили 560 мг/день PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения. CR = полный ответ. PR=частичный ответ. SD=Стабильное течение заболевания. PD=Прогрессирующее течение заболевания.

На фиг. 20 представлено абсолютное число лимфоцитов (ALC) (слева) или сумма произведений диаметров (SPD) лимфатических узлов (LN) (справа) в случае монотерапии PCI-32756 или комбинации с офатумумабом во время курса терапии необратимым ингибитором Btk (PCI-32765) у пациентов с CLL/SLL, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение 28 дней во время цикла 1. Офатумумаб вводили в дозе 300 мг на день 1 цикла 2 с последующими 2000 мг на дни 8, 15 и 22 цикла 2, дни 1, 8, 15 и 22 цикла 3, затем на день 1 циклов 5-8.

На фиг. 21 представлены гистологические данные, показывающие мобилизацию лимфоцитов с последующими 12 циклами терапии PCI-32765 при 420 мг/сутки в комбинации с офатумумабом у пациентов с CLL/SLL, как описано на фиг. 20.

Фиг. 22 представляет абсолютное число лимфоцитов (ALC) (слева) или сумму произведений диаметров (SPD) лимфатических узлов (LN) (справа) в случае монотерапии PCI-32756 или комбинации с бендамустином во время курса лечения необратимым ингибитором Btk (PCI-32765) пациентов с CLL/SLL, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 28-дневными циклами. Бендамустин вводили при 70 мг/м² (d1-2) и ритуксимаб при 375 мг/м² (цикл 1) или 500 мг/м² (циклы 2-6) в течение 6 циклов.

На фиг. 23 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk и карбоплатина или велкейда в клетках DoHH2 (PCI-32765).

На фиг. 24 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и дексаметазона или леналидомида в клетках DoHH2.

На фиг. 25 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и темсиrolимуса или R406 в клетках DoHH2.

На фиг. 26 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и гемцитабина или доксорубина в клетках DoHH2.

На фиг. 27 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и Cal-101 в клетках TMD8.

На фиг. 28 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и R406 в клетках TMD8.

На фиг. 29 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и винкристина в клетках TMD8.

На фиг. 30 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и доксорубина в клетках TMD8.

На фиг. 31 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и ленолидомида в клетках TMD8.

На фиг. 32 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и велкейда в клетках TMD8.

На фиг. 33 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и флударабина в клетках TMD8.

На фиг. 34 представлены данные, показывающие результаты комбинации ингибитора Btk (PCI-32765) и таксола в клетках TMD8.

На фиг. 35 представлены данные, показывающие график линий потока выделяемых лимфоцитов образцов PBMC от репрезентативного субъекта с MCL до и после терапии PCI-32756 (ибрутинином) (560 мг/сутки) в течение 7 дней. PBMC окрашивали CD3, CD19 и CD5. Отмечалось увеличение популяции CD19⁺CD3⁺ и CD19⁺CD5⁺ через 7 дней терапии лекарственным средством.

На фиг. 36 представлены данные, показывающие, что клетки CD19⁺CD5⁺ имеют пониженные CXCR4, CD38 и Ki67 после терапии PCI-32765 (ибрутинином). (A) Значительное уменьшение экспрессии поверхностного CXCR4 в клетках CD19⁺CD5⁺ после одной недели терапии ибрутинином. (B) Уменьшение экспрессии CD38 в клетках CD19⁺CD5⁺, но не в клетках CD19⁺CD5⁻ в течение 4 недель терапии у 4 субъектов, получавших лечение ибрутинином. (C) Поверхностная экспрессия CD38 (p<0.01) (слева) и внутриклеточного Ki67 (p<0.05) (справа) значительно уменьшена после одной недели терапии. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) внутриклеточных фосфо-Erk (pT202/Y204/Erk1/2) CD20⁺CD5⁺ PBMC от здоровых субъектов или пациентов с MCL, получавших лечение ибрутинином перед терапией (D1) и после 1 недели терапии (D8) (внизу). (D) Экспрессия CXCR4 и CD38 из биопсий лимфатических узлов и PBMC трех пациентов с лимфомой MCL (субъекты A, B, C), не получавших лечение лекарственным средством. (E) Процентное изменение в плазме концентраций хемокина и цитокина на День 8 (слева) или День 29 (справа) у пациентов с MCL, получавших лечение ибрутинином, по сравнению с показателями до лечения (n=9).

На фиг. 37 представлены данные, показывающие, что PCI-32765 (ибрутиниб) ингибирует миграцию клеток MCL под стромальные клетки (псевдоэмпериополь) и формирование CXCL12 стимулировано кортикальным актином. (A) Клетки Mino предварительно обрабатывали увеличивающимися дозами ибрутинива или носителем в течение 30 мин и затем помещали в заселенный стромальными клетками планшет. Через 4 часа сокультуру отмывали несколько раз, и мигрировавшие и адгезировавшие клетки Mino оценивали и подсчитывали на проточном цитометре с использованием калибровочных микрочастиц (calibrated beads) после окрашивания hCD19, и оценивали на популяцию CD19⁺. Оба, коклюшный токсин и ибрутиниб, дозозависимо ингибировали мигрировавшие и адгезировавшие клетки Mino (слева). Клетки Mino, стимулированные CXCL12 и обработанные носителем или лекарственным средством, окрашивали фаллоидином, и его интенсивность определяли с использованием проточной цитометрии (справа). (B) ибрутиниб (100 нМ) ингибировал псевдоэмпериополь первичной MCL (клетки hCD19⁺) в сокультуре с M2 стромальными клетками (левая панель).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

В настоящее время существует потребность в способах лечения (включая диагностику) гематологических злокачественных опухолей, включая рецидивирующие и рефрактерные В-клеточные злокачест-

венные опухоли, и ABC-DLBCL. Настоящая заявка на патент отчасти основана на неожиданном открытии того, что ингибиторы Btk индуцируют мобилизацию (или, в некоторых случаях, лимфоцитоз) лимфоидных клеток в солидных гематологических злокачественных опухолях. Мобилизация лимфоидных клеток увеличивает воздействие на них дополнительной противоопухолевой терапии и их пригодность для скрининга с использованием биомаркеров.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыта комбинация:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101;

в которой необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), макроглобулинемию Вальденстрема, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или фолликулярную лимфому (FL).

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение комбинации:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101;

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм, для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыто применение комбинации:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101;

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм, для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, где GA 101 вводят субъекту, когда субъект идентифицирован как имеющий увеличенную мобилизацию множества клеток из злокачественной опухоли после введения необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем идентификация увеличения мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли основана на детекции присутствия, экспрессии или уровня экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CXCR4, Ki67, MDC, MIP-1 β , CXCL-13, CXCL17, IL-10, MIP-1 α , CCL17 и CCL21.

Некоторая терминология

Если не определено иначе, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют значения, общепринятые среди специалистов в областях, к которым принадлежит изобретение. В случае, если имеется множество определений для терминов, действительным считается описанный в настоящем разделе. Следует обратить внимание, что в случае, если ссылка дана в виде URL или в виде аналогичного адреса или идентификатора, очевидно, что идентификатор может меняться, а конкретная информация в Интернете может появляться и исчезать, но при этом эквивалентная информация может быть найдена путем Интернет-поиска. Ссылка на данную информацию свидетельствует о том, что она доступна и ее можно распространять.

Очевидно, что приведенное выше краткое описание и приведенное ниже подробное описание изобретения даны исключительно с иллюстративной целью и ни в коей мере не ограничивают ни один из заявленных объектов. Если не определено иное, использование в настоящем документе единственного числа также может включать множественное число. Следует заметить, что при использовании в описании и прилагаемой формуле существительных в единственном числе может также включать множественное число, если обратное недвусмысленно не следует из контекста. Если не определено иначе, использование в настоящем описании союза "или" подразумевает "и/или". Кроме того, использование терминов "к которым относятся", "включая", и их синонимов не является ограничивающим.

Используемые в настоящем документе названия разделов даны с целью упорядочения информации, а не с целью ограничения заявленных объектов. Все цитируемые в настоящем описании документы или выдержки из документов, включая, но не ограничиваясь ими, патенты, заявки на патенты, статьи, книги, инструкции и научные работы, непосредственно включены в настоящее описание посредством отсылки во всей своей полноте для любых целей.

Определения стандартных химических терминов можно найти в работах, ссылки на которые приве-

дены в настоящем описании, в том числе Carey and Sundberg "Advanced Organic Chemistry 4th Ed." Vols. A (2000) and B (2001), Plenum Press, New York. Если отдельно не указано иное, в работе применялись стандартные методы масс-спектрометрии, ЯМР, ВЭЖХ, химии белков, биохимии, технологий рекомбинантных ДНК и фармакологии, в соответствии с известным уровнем техники. Если не даны специальные определения, используемая номенклатура и описанные в настоящем изобретении лабораторные процедуры и методики аналитической химии, химия органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии известны из уровня техники. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического производства, составления композиций, доставки и лечения пациентов можно применять стандартные. К рекомбинантным ДНК, для синтеза олигонуклеотидов, к культуре ткани и для трансформации (например, электропорация, липофекция) можно применять стандартные техники. Реакции и способы очистки можно осуществлять, например, с использованием наборов согласно спецификации производителя, или как это принято в соответствующей области, или как описано в настоящем изобретении. Изложенные ниже методики и процедуры можно, как правило, осуществлять с использованием распространенных методов, известных из уровня техники, а также описанных в различных источниках, как в общих, так и более частных, на которые дана ссылка и которые рассмотрены в настоящем описании.

Следует заметить, что описанные в настоящем изобретении способы и композиции не ограничены конкретными методологиями, протоколами, клеточными линиями, конструктами и реагентами, которые описаны в настоящем документе и могут варьировать. Также следует заметить, что используемая в настоящем документе терминология используется исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления и не ограничивает объем описанных способов и композиций, которые ограничивает только прилагаемая формула изобретения.

Все упоминаемые в настоящем документе публикации и патенты включены в настоящее изобретение посредством отсылки во всей своей полноте с целью описания и раскрытия, например, конструктов или способов, которые описанных в данных публикациях, которые могут быть использованы вместе со способами, композициями и соединениями, описанными в настоящем документе. Рассматриваемые в настоящем документе публикации были обнародованы до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто в настоящем документе не может быть истолковано как признание того, что изобретатели не полномочны указать более раннюю дату подачи заявки в силу предшествующего изобретения или каких-либо других причин.

"Алкильная" группа относится к алифатической углеводородной группе. Алкильный фрагмент может представлять собой "насыщенную алкильную" группу, что означает, что она не содержит ни одного алкенового или алкинового фрагмента. Алкильный фрагмент может также представлять собой "ненасыщенный алкильный" фрагмент, что означает, что он содержит по меньшей мере один алкеновый или алкиновый фрагмент. "Алкеновый" фрагмент относится к группе, которая содержит по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, и "алкиновый" фрагмент относится к группе, которая содержит по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Алкильный фрагмент, как насыщенный, так и ненасыщенный, может быть разветвленным, прямым или циклическим. В зависимости от структуры алкильная группа может представлять собой монорадикал или бирадикал (то есть алкиленовую группу). Алкильная группа может также быть "низшим алкилом", содержащим от 1 до 6 атомов углерода.

Используемое в настоящем документе обозначение C_1-C_x включает C_1-C_2 , C_1-C_3 , C_1-C_x .

"Алкильный" фрагмент может содержать от 1 до 10 атомов углерода (при любом его появлении в настоящем документе, численный диапазон, такой как "от 1 до 10" относится к каждому целому числу в указанном диапазоне; например "от 1 до 10 атомов углерода" означает, что алкильная группа может содержать 1 атом углерода, 2 атома углерода, 3 атома углерода и т.д., до 10 атомов углерода включительно, хотя данное определение также охватывает появление термина "алкил" без указания численного диапазона). Алкильная группа соединений, описанных в настоящем документе, может быть обозначена как " C_1-C_4 алкил" или сходными обозначениями.

Только в качестве примера, " C_1-C_4 алкил" означает, что в алкильной цепи содержится от одного до четырех атомов углерода, то есть алкильная цепь выбрана из метила, этила, пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Таким образом, C_1-C_4 алкил включает C_1-C_2 алкил и C_1-C_3 алкил. Алкильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Типичные алкильные группы включают, но никоим образом не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, третичный бутил, пентил, гексил, этенил, пропенил, бутенил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.

Термин "нециклический алкил", используемый здесь, относится к алкилу, который не является циклическим (то есть с прямой или разветвленной цепью, содержащий по меньшей мере один атом углерода). Нециклические алкилы могут быть полностью насыщенными или могут содержать нециклические алкены и/или алкины. Нециклические алкилы могут быть необязательно замещенными.

Термин "алкенил" относится к типу алкильной группы, в которой первые два атома алкильной группы образуют двойную связь, которая не является частью ароматической группы. То есть, алкенильная группа начинается с атомов $-C(R)=C(R)-R$, где R относится к остальным частям алкенильной группы, которые могут быть одинаковыми или различными. Алкенильный фрагмент может быть с разветвлен-

ной, прямой цепью или циклическим (в этом случае он также известен как "циклоалкенильная" группа). В зависимости от структуры алкенильная группа может быть монадикальной или бирадикальной (то есть, алкениленовой группой). Алкенильные группы могут быть необязательно замещенными. Неограничивающие примеры алкенильных групп включают $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$. Алкениленовые группы включают, но без ограничения, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ и $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_2-$. Алкенильные группы могут содержать от 2 до 10 атомов углерода. Алкенильная группа может также представлять собой "низший алкенил", содержащий от 2 до 6 атомов углерода.

Термин "алкинил" относится к типу алкильной группы, в которой первые два атома алкильной группы образуют тройную связь. То есть, алкинильная группа начинается с атомов $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$, где R относится к остальным частям алкинильной группы, которые могут быть одинаковыми или различными. Часть "R" алкинильного фрагмента может быть разветвленной, линейной цепью или циклической. В зависимости от структуры алкинильная группа может быть монадикальной или бирадикальной (то есть алкиниленовой группой). Алкинильные группы могут быть необязательно замещенными. Неограничивающие примеры алкинильной группы включают, но без ограничения, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$ и $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2-$. Алкинильные группы могут содержать от 2 до 10 атомов углерода. Алкинильная группа может также представлять собой «низший алкинил», содержащий от 2 до 6 атомов углерода.

"Алкокси" группа относится к группе (алкил)О-, в которой алкил является таким, как определено выше.

"Гидроксикал" относится к алкильному радикалу, как определено здесь, замещенному по меньшей мере одной гидроксильной группой. Неограничивающие примеры гидроксикала включают, но без ограничения, гидроксиметил, 2-гидроксиэтил, 2-гидроксипропил, 3-гидроксипропил, 1-(гидроксиметил)-2-метилпропил, 2-гидроксибутил, 3-гидроксибутил, 4-гидроксибутил, 2,3-дигидроксипропил, 1-(гидроксиметил)-2-гидроксиэтил, 2,3-дигидроксибутил, 3,4-дигидроксибутил и 2-(гидроксиметил)-3-гидроксипропил.

"Алкоксикал" относится к алкильному радикалу, как определено в настоящем документе, замещенному алкоксигруппой, как определено в настоящем документе.

"Алкенилокси" группа относится к группе (алкенил)О-, в которой алкенил является таким, как определено в настоящем документе.

Термин "алкиламин" относится к группе $-\text{N}(\text{alkyl})_x\text{H}_y$, где x и y выбраны из x=1, y=1 и x=2, y=0. Когда x=2, алкильные группы, взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, могут необязательно образовывать циклическую кольцевую систему.

"Алкиламиноалкил" относится к алкильному радикалу, как определено в настоящем документе, замещенному алкиламином, как определено в настоящем документе.

"Амид" представляет собой химический фрагмент, имеющий формулу $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}$ или $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, гетероарила (связанного через кольцевой атом углерода) и гетероалициклической группы (связанной через кольцевой атом углерода). Амидный фрагмент может формировать связь между молекулой аминокислоты или пептида и соединением, описанным здесь, тем самым образуя пролекарство. Любая аминная или карбоксильная боковая цепь в соединениях, описанных здесь, может быть амидирована. Методики и конкретные группы для получения таких амидов известны специалистам в данной области и могут быть легко найдены в справочных материалах, таких как Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, содержание которого включено в настоящую заявку посредством отсылки в полном объеме.

Термин "сложный эфир" относится к химическому фрагменту, имеющему формулу $-\text{COOR}$, где R выбран из алкила, циклоалкила, арила, гетероарила (связанного через кольцевой атом углерода) и гетероалициклической группы (связанной через кольцевой атом углерода). Любая гидрокси- или карбоксильная боковая цепь соединений, описанных здесь, может быть этерифицирована. Способы и конкретные группы для получения таких сложных эфиров известны специалистам в данной области и могут быть легко найдены в справочных материалах, таких как Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, содержание которого включено в настоящую заявку посредством отсылки в полном объеме.

Термин "кольцо", используемый здесь, относится к любой ковалентно замкнутой структуре. Кольца включают, например, карбоциклы (например, арилы и циклоалкилы), гетероциклы (например, гетероарилы и неароматические гетероциклы), ароматические соединения (например, арилы и гетероарилы) и неароматические соединения (например, циклоалкилы и неароматические гетероциклы). Кольца могут быть необязательно замещенными. Кольца могут быть моноциклическими или полициклическими.

Термин "кольцевая система", используемый здесь, относится к одному или более чем одному кольцу.

Термин "-членное кольцо" может охватывать любую циклическую структуру. Термин "-членное" предназначен для указания числа скелетных атомов, которые составляют кольцо. Так, например, циклогексил, пиридин, пиран и тиопиран представляют собой 6-членные кольца, а цикlopентил, пиррол, фуран

и тиофен представляют собой 5-членные кольца.

Термин "конденсированная" относится к структурам, в которых два или более колец делят между собой одну или более связей.

Термин "карбоциклический" или "карбоцикл" относится к кольцу, в котором каждый из атомов, формирующих кольцо, представляет собой атом углерода. Карбоцикл включает арил и циклоалкил. Этот термин, таким образом, проводит отличие карбоцикла от гетероцикла ("гетероциклического соединения"), в котором основная цепь содержит по меньшей мере один атом, отличный от углерода (т.е. гетероатом). Гетероцикл включает гетероарил и гетероциклоалкил. Карбоциклы и гетероциклы могут быть необязательно замещенными.

Термин "ароматическое" относится к плоскому кольцу, имеющему делокализованную систему π -электронов, содержащую $4n+2\pi$ электронов, где n представляет собой целое число. Ароматические кольца могут быть образованы из пяти, шести, семи, восьми, девяти или более чем девяти атомов. Ароматические соединения могут быть необязательно замещенными. Термин "ароматические" включает как карбоциклические арильные (например, фенил), так и гетероциклические арильные ("гетероарильные" или "гетероароматические") группы (например, пиридин). Термин включает моноциклические или полициклические, имеющие конденсированные кольца (т.е. кольца, которые делят между собой соседние пары атомов углерода), группы.

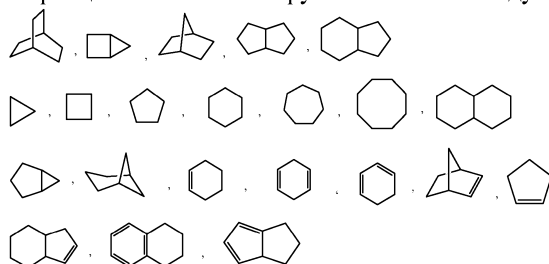
Термин "арил", используемый здесь, относится к ароматическому кольцу, в котором каждый из атомов, формирующих кольцо, представляет собой атом углерода. Арильные кольца могут быть образованы пятью, шестью, семью, восемью, девятью или более чем девятью атомами углерода. Арильные группы могут быть необязательно замещенными. Примеры арильных групп включают, но без ограничения, фенил, нафталенил, фенантренил, антраценил, флуоренил и инденил. В зависимости от структуры, арильная группа может быть монорадикалом или бирадикалом (т.е. ариленовой группой).

"Арилокси" группа относится к группе (арил)О-, где арил представляет собой такой, как определено здесь.

"Аралкил" означает алкильный радикал, как определено здесь, замещенный арильной группой. Неограничивающие аралкильные группы включают бензил, фенетил и т.п.

"Аралкенил" означает алкенильный радикал, как определено здесь, замещенный арильной группой, как определено здесь.

Термин "циклоалкил" относится к моноциклическому или полициклическому радикалу, который содержит только атомы углерода и водорода, и может быть насыщенным, частично ненасыщенным или полностью ненасыщенным. Циклоалкильные группы включают группы, содержащие от 3 до 10 атомов в кольце. Иллюстративные примеры циклоалкильных групп включают следующие фрагменты:



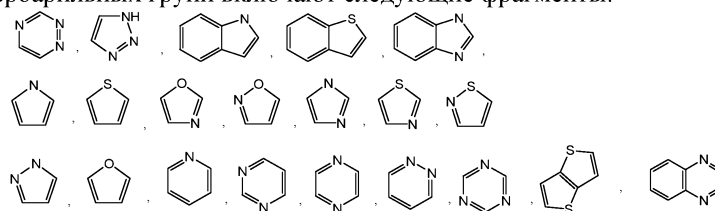
и т.п. В зависимости от структуры циклоалкильная группа может быть монорадикалом или бирадикалом (например, циклоалкиленовой группой). Циклоалкильная группа может также представлять собой "низший циклоалкил", содержащий от 3 до 8 атомов углерода.

"Циклоалкилалкил" означает алкильный радикал, как определено здесь, замещенный циклоалкильной группой. Неограничивающие циклоалкилалкильные группы включают циклопропилметил, циклобутилметил, цикlopентилметил, циклогексилметил и т.п.

Термин "гетероцикл" относится к гетероароматическим и гетероалициклическим группам, содержащим от одного до четырех гетероатомов, каждый, выбранный из О, S и N, при этом каждая гетероциклическая группа содержит от 4 до 10 атомов в своей кольцевой системе, и при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух соседних атомов О или S. При этом, во всех случаях, когда указано число атомов углерода в гетероцикле (например, C_1 - C_6 гетероцикл), по меньшей мере один другой атом (гетероатом) должен присутствовать в кольце. Обозначения, такие как " C_1 - C_6 гетероцикл", относятся только к числу атомов углерода в кольце и не относятся к общему числу атомов в кольце. Следует понимать, что гетероциклическое кольцо может содержать дополнительные гетероатомы в кольце. Обозначения, такие как "4-6-членный гетероцикл", относятся к общему числу атомов, содержащихся в кольце (т.е. четырех-, пяти- или шестичленному кольцу, в котором по меньшей мере один атом представляет собой атом углерода, по меньшей мере один атом представляет собой гетероатом, и остальные от двух до четырех атомов представляют собой атомы углерода или гетероатомы). В гетероциклах, которые содержат два или более гетероатомов, эти два или более гетероатомов могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. Гетероциклы могут быть необязательно замещенными. Связывание с гетероциклом может

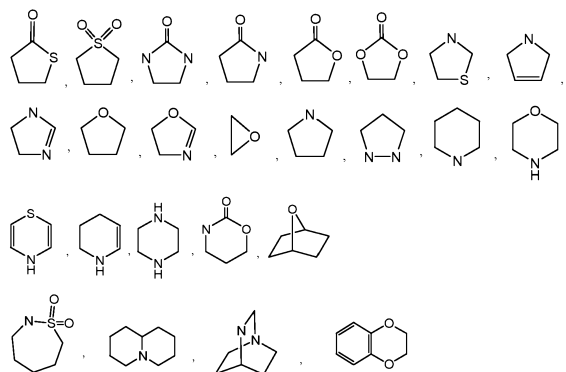
быть у гетероатома или через атом углерода. Неароматические гетероциклические группы включают группы, содержащие только 4 атома в своей кольцевой системе, но ароматические гетероциклические группы должны содержать по меньшей мере 5 атомов в своей кольцевой системе. Гетероциклические группы включают бензоконденсированные кольцевые системы. Примером 4-членной гетероциклической группы является азетидинил (полученный из азетидина). Примером 5-членной гетероциклической группы является тиазолил. Примером 6-членной гетероциклической группы является пиридил, и примером 10-членной гетероциклической группы является хинолинил. Примерами неароматических гетероциклических групп служат пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротиопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиеганил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, диазепинил, тиазепинил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2Н-пиранил, 4Н-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, 3Н-индолил и хинолизинил. Примерами ароматических гетероциклических групп служат пиридинил, имидазолил, пиримидинил, пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолзинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуридил, оксадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил. Указанные группы, производные приведенных выше групп, могут быть С-присоединенными или N-присоединенными, если такое возможно. Например, группа, производная от пиррола, может представлять собой пиррол-1-ил (N-присоединенный) или пиррол-3-ил (С-присоединенный). Затем, группа, производная от имидазола, может представлять собой имидазол-1-ил или имидазол-3-ил (обе N-присоединенные) или имидазол-2-ил, имидазол-4-ил или имидазол-5-ил (все С-присоединенные). Гетероциклические группы включают бензоконденсированные кольцевые системы и кольцевые системы, замещенные одним или двумя оксо- (=О) фрагментами, такие как пирролидин-2-он. В зависимости от структуры, гетероциклическая группа может быть монарадикалом или бирадикалом (т.е. гетероцикленовой группой).

Термины "гетероарил" или, альтернативно, "гетероароматическая" относятся к арильной группе, которая включает один или более кольцевых гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы. N-содержащий "гетероароматический" или "гетероарильный" фрагмент относится к ароматической группе, в которой по меньшей мере один из скелетных атомов кольца представляет собой атом азота. Иллюстративные примеры гетероарильных групп включают следующие фрагменты:



и т.п. В зависимости от структуры, гетероарильная группа может быть монарадикалом или бирадикалом (т.е. гетероариленовой группой).

Термин "неароматический гетероцикл", "гетероциклоалкил" или "гетероалициклический", используемый здесь, относится к неароматическому кольцу, в котором один или более атомов, формирующих кольцо, представляют собой гетероатом. "Неароматическая гетероциклическая" или "гетероциклоалкильная" группа относится к циклоалкильной группе, которая содержит по меньшей мере один гетероатом, выбранный из азота, кислорода и серы. Радикалы могут быть конденсированы с арилом или гетероарилом. Гетероциклоалкильные кольца могут быть образованы тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или более чем девятью атомами. Гетероциклоалкильные кольца могут быть необязательно замещенными. В определенных вариантах осуществления неароматические гетероциклы содержат одну или более карбонильных или тиокарбонильных групп, таких как, например, оксо- и тио-содержащие группы. Примеры гетероциклоалкилов включают, но без ограничения, лактамы, лактоны, циклические имиды, циклические тиоимиды, циклические карбаматы, тетрагидротиопиран, 4Н-пиран, тетрагидропиран, пиперидин, 1,3-диоксин, 1,3-диоксан, 1,4-диоксин, 1,4-диоксан, пиперазин, 1,3-оксатиан, 1,4-оксатиин, 1,4-оксатиан, тетрагидро-1,4-тиазин, 2Н-1,2-оксазин, малеимид, сукцинимид, барбитуровую кислоту, тиобарбитуровую кислоту, диоксопиперазин, гидантоин, дигидроурацил, морфолин, триоксан, гексагидро-1,3,5-триазин, тетрагидротиофен, тетрагидрофуран, пирролин, пирролидин, пирролидон, пирролидион, пиразолин, пиразолин, пиразолидин, имидазолин, имидазолидин, 1,3-диоксол, 1,3-диоксолан, 1,3-дитиол, 1,3-дитиолан, изоксазолин, изоксазолидин, оксазолин, оксазолидин, оксазолидинон, тиазолин, тиазолидин и 1,3-оксатиолан. Иллюстративные примеры гетероциклоалкильных групп, также называемых как неароматические гетероциклы, включают



и т.п. Термин "гетероалициклический" также включает все кольцевые формы углеводов, включая, но без ограничения, моносахариды, дисахариды и олигосахариды. В зависимости от структуры, гетероциклоалкильная группа может быть монарадикалом или бирадикалом (т.е. гетероциклоалкиленовой группой).

Термин "гало" или, альтернативно, "галоген" или "галогенид" означает фтор, хлор, бром и йод.

Термины "галогеналкил", "галогеналкенил", "галогеналкинил" и "галогеналкокси" включают алкил, алкенил, алкинил и алкокси структуры, в которых по меньшей мере один атом водорода замещен атомом галогена. В определенных вариантах осуществления, в которых два или более атомов водорода замещены атомами галогена, все атомы галогена являются одинаковыми. В других вариантах осуществления, в которых два или более атомов водорода замещены атомами галогена, не все атомы галогена являются одинаковыми.

Термин "фторалкил", используемый здесь, относится к алкильной группе, в которой по меньшей мере один атом водорода замещен атомом фтора. Примеры фторалкильных групп включают, но без ограничения, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ и т.п.

Термины "гетероалкил", "гетероалкенил" и "гетероалкинил", используемые здесь, включают необязательно замещенные алкильные, алкенильные и алкинильные радикалы, в которых один или более атомов в основной цепи представляют собой гетероатомы, например кислород, азот, серу, кремний, фосфор или их комбинацию. Гетероатом(ы) находится в любом положении внутри гетероалкильной группы или в положении, в котором гетероалкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают, но без ограничения, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ и $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Кроме того, до двух гетероатомов могут быть последовательными, например, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ и $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Термин "гетероатом" относится к атому, отличному от атома углерода или водорода. Гетероатомы обычно независимо выбраны из кислорода, серы, азота, кремния и фосфора, но не ограничиваются этими атомами. В вариантах осуществления, в которых присутствуют два или более гетероатомов, указанные гетероатомы все могут быть одинаковыми, или же некоторые или все из двух или более гетероатомов могут быть отличными от других.

Термин "связь" или "одинарная связь" относится к химической связи между двумя атомами или двумя фрагментами, когда атомы, соединенные связью, считаются частью более крупной подструктуры.

Группа "изоцианато" относится к группе $-\text{NCO}$.

Группа "изотиоцианато" относится к группе $-\text{NCS}$.

Термин "фрагмент" относится к специфическому сегменту или функциональной группе молекулы. Химическими фрагментами часто признаются химические структурные единицы, встроенные или присоединенные к молекуле.

"Сульфинильная" группа относится к $-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$.

"Сульфонильная" группа относится к $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{R}$.

"Тиоалкокси" или "алкилтио" группа относится к $-\text{S}$ -алкильной группе.

"Алкилтиоалкильная" группа относится к алкильной группе, замещенной $-\text{S}$ -алкильной группой.

Термин "О-карбоксо" или "ацилокси", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{RC}(=\text{O})\text{O}-$.

"Карбоксо" означает радикал $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$.

Термин "ацетил", используемый здесь, относится к группе формулы $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$.

"Ацил" относится к группе $-\text{C}(\text{O})\text{R}$.

Термин "тригалогенометансульфонил", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{X}_3\text{CS}(=\text{O})_2-$, где X представляет собой галоген.

Термин "циано", используемый здесь, относится к группе формулы $-\text{CN}$.

"Цианоалкил" означает алкильный радикал, как определено здесь, замещенный по меньшей мере одной цианогруппой.

Термин "N-сульфонамидо" или "сульфониламино", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{RS}(=\text{O})_2\text{NH}-$.

Термин "О-карбамил", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_2$.

Термин "N-карбамил", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{ROC}(=\text{O})\text{NH}$.

Термин "О-тиокарбамил", используемый здесь, относится к группе формулы $-\text{OC}(=\text{S})\text{NR}_2$.

Термин "N-тиокарбамил", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{ROC}(=\text{S})\text{NH}$.

Термин "С-амидо", используемый здесь, относится к группе формулы $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$.

"Аминокарбонил" относится к радикалу $-\text{CONH}_2$.

Термин "N-амидо", используемый здесь, относится к группе формулы $\text{RC}(=\text{O})\text{NH}$.

Заместитель "R", используемый здесь, появляющийся как таковой и без числового обозначения, относится к заместителю, выбранному из алкила, циклоалкила, арила, гетероарила (связанного через кольцевой атом углерода) и неароматического гетероцикла (связанного через кольцевой атом углерода).

Термин "необязательно замещенная" или "замещенная" означает, что указанная группа может быть замещена одной или более дополнительными группами, индивидуально и независимо выбранными из алкильной, циклоалкильной, арильной, гетероарильной, гетероалициклической, гидроксидной, алкоксидной, арил-, алкил-, арилсульфоксидной, алкилсульфоксидной, алкилсульфоно-, арилсульфоно-, циано-, галогено-, ацильной, нитро-, галогеналкильной, фторалкильной, амина-, включая моно- и дизамещенные аминогруппы, и их защищенные производные. В качестве примера, необязательные заместители могут представлять собой L_sR_s , где каждый L_s независимо выбран из связи, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{NHS}(=\text{O})_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-(\text{замещенного или незамещенного } \text{C}_1-\text{C}_6\text{алкила})$, или $-(\text{замещенного или незамещенного } \text{C}_2-\text{C}_6\text{алкенила})$; и каждый R_s независимо выбран из H , (замещенного или незамещенного C_1-C_4 алкила), (замещенного или незамещенного C_3-C_6 циклоалкила), гетероарила или гетероалкила. Защитные группы, которые могут образовывать защищенные производные указанных выше заместителей, известны специалистам в данной области и могут быть найдены в ссылках, указанных выше, таких как Greene and Wuts.

Термин "фрагмент акцептора Михаэля" относится к функциональной группе, которая может участвовать в реакции Михаэля, когда между частью фрагмента акцептора Михаэля и фрагментом донора образуется новая ковалентная связь. Фрагмент акцептора Михаэля является электрофилом, а "фрагмент донора" является нуклеофилом.

Термин "нуклеофил" или "нуклеофильный" относится к богатому электронами соединению или его фрагменту. Примером нуклеофила является, но без ограничения, цистеиновый остаток в молекуле, такой как, например, Cys 481 Btk.

Термин "электрофил" или "электрофильный" относится к молекуле, обедненной электронами или к молекуле с дефицитом электронов, или ее фрагменту. Примеры электрофилов включают, но никоим образом не ограничиваются ими, фрагменты акцептора Михаэля.

Термин "приемлемый" или "фармацевтически приемлемый" в отношении состава, композиции или ингредиента, используемый здесь, означает отсутствие устойчивого вредного воздействия на общее состояние здоровья субъекта, проходящего лечение, или сохранение биологической активности или свойств соединения, а также относительную нетоксичность.

"Биомаркеры В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (BCLD)", используемые здесь, относятся к любой биологической молекуле (обнаруженной в крови, других жидкостях организма или в тканях) или любой хромосомной аберрации, которая является признаком связанного с BCLD состояния или заболевания.

Термин "опухоль", используемый здесь, относится к росту и пролиферации всех опухолевых клеток, независимо от того, являются ли они злокачественными или доброкачественными, и ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. "Опухолевый", используемый здесь, относится к любой форме неуправляемого или неконтролируемого роста клеток, злокачественных или доброкачественных, в результате чего происходит аномальный рост тканей. Таким образом, "опухолевые клетки" включают злокачественные и доброкачественные клетки, характеризующиеся неуправляемым или неконтролируемым ростом.

Термины "рак" и "раковый" означают или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется неуправляемым ростом клеток. Примеры рака включают, но без ограничения, В-клеточные лимфопролиферативные заболевания (BCLD), такие как лимфома и лейкоз, а также солидные опухоли. Под "В-клеточный рак" или "рак В-клеточной линии" понимается рак любого типа, в котором неуправляемый или неконтролируемый рост клеток ассоциирован с В-клетками.

Под "рефрактерный" в контексте рака понимается, что определенный рак является устойчивым или невосприимчивым к лечению конкретным терапевтическим агентом. Рак может быть рефрактерным к терапии конкретным терапевтическим агентом, полученным после начала лечения конкретным терапевтическим агентом (т.е. невосприимчив к первоначальному воздействию терапевтического агента), или в результате развития устойчивости к терапевтическому агенту в течение первого периода лечения терапевтическим агентом или во время последующего лечения терапевтическим агентом.

Под "агонистической активностью" предполагается, что вещество функционирует в качестве агониста. Агонист объединяется с рецептором на клетке и инициирует реакцию или активность, которая сходна или является такой же, что и активность, инициированная природным лигандом рецептора.

Под "антагонистической активностью" предполагается, что вещество функционирует в качестве антагониста. Антагонист Btk предупреждает или уменьшает индукцию любых ответов, опосредованных Btk.

Под "значительной" агонистической активностью понимается агонистическая активность, которая по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% больше, чем агонистическая активность, индуцированная нейтральным веществом или отрицательным контролем, определяемая в анализе В-клеточного ответа. Предпочтительно "значительная" агонистическая активность представляет собой агонистическую активность, которая по меньшей мере в 2 раза больше или по меньшей мере в 3 раза больше агонистической активности, индуцированной нейтральным веществом или отрицательным контролем, определяемая в анализе В-клеточного ответа. Таким образом, например, в тех случаях, когда представляющий интерес В-клеточный ответ представляет собой пролиферацию В-клеток, "значительной" агонистической активностью будет индукция уровня пролиферации В-клеток, которая по меньшей мере в 2 раза больше или по меньшей мере в 3 раза больше, чем уровень В-клеточной пролиферации, индуцированный нейтральным веществом или негативным контролем.

Вещество "не имеющее значительной агонистической активности" будет проявлять агонистическую активность, которая не более чем примерно на 25% больше, чем агонистическая активность, индуцированная нейтральным веществом или отрицательным контролем, предпочтительно не более чем примерно на 20% больше, 15% больше, 10% больше, 5% больше, 1% больше, 0,5% больше или даже не более чем примерно на 0,1% больше, чем агонистическая активность, индуцированная нейтральным веществом или отрицательным контролем, определяемая в анализе В-клеточного ответа.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент, ингибитор Btk, представляет собой анти-Btk антитело антагонист. Такие антитела не имеют значительной агонистической активности, как указано выше, при связывании с антигеном Btk в человеческой клетке. В одном варианте осуществления изобретения анти-Btk антитело антагонист не имеет значительной агонистической активности в одном клеточном ответе. В другом варианте осуществления изобретения анти-Btk антитело антагонист не имеет значительной агонистической активности в анализах больше чем одного клеточного ответа (напр., пролиферация и дифференциация, или пролиферация, дифференциация и, для В-клеток, выработка антител).

Под "Btk-опосредованной сигнализацией" понимается любая из биологических активностей, которые зависят напрямую или опосредованно от активности Btk. Примерами Btk-опосредованной сигнализации являются сигналы, которые приводят к пролиферации и выживаемости Btk-экспрессирующих клеток, и стимуляции одного или более Btk-сигнальных путей в Btk-экспрессирующих клетках.

"Сигнальный путь" Btk или "путь сигнальной трансдукции" означает по меньшей мере одну биохимическую реакцию или группу биохимических реакций, которые происходят в результате активности Btk и которые генерируют сигнал, который при передаче по сигнальному пути приводит к активации одной или более последующих молекул в сигнальном каскаде. Пути сигнальной трансдукции включают ряд молекул сигнальной трансдукции, которые приводят к передаче сигнала от клеточной поверхности через плазматическую мембрану клетки и через одну или более в сериях молекул сигнальной трансдукции, через цитоплазму клетки, и в некоторых случаях в клеточное ядро. Особый интерес для настоящего изобретения представляют пути трансдукции сигнала Btk, которые в конечном итоге регулируют (либо усиливают, либо ингибируют) активацию NF-κB через сигнальный путь NF-κB.

Способы по настоящему изобретению направлены на способы лечения рака, которые в определенных вариантах осуществления используют антитела для определения экспрессии или присутствия определенных биомаркеров BCLD в этих способах. Следующие термины и определения применяются в отношении таких антител.

"Антитела" и "иммуноглобулины" (Igs) представляют собой гликопротеины, имеющие одинаковые структурные характеристики. Термины используются как синонимы. В некоторых случаях антигенная специфичность иммуноглобулина может быть известной.

Термин "антитело" используется в самом широком смысле и охватывает полностью собранные антитела, фрагменты антител, которые могут связывать антиген (напр., Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечные антитела, диатела, химерные антитела, гибридные антитела, биспецифические антитела, гуманизированные антитела и т.п.) и рекомбинантные пептиды, содержащие вышеуказанные фрагменты.

Термины "моноклональное антитело" и "mAb", используемые здесь, относятся к антителу, полученному из популяции в основном гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением образующихся в результате природных мутаций, которые могут находиться в минорных количествах.

"Нативные антитела" и "нативные иммуноглобулины" обычно представляют собой гетеротетраммерные гликопротеины длиной около 150000 дальтан, состоящие из двух идентичных легких цепей (L) и двух идентичных тяжелых цепей (H). Каждая легкая цепь присоединена к тяжелой цепи одной ковалентной дисульфидной связью, при этом число дисульфидных связей может быть различным для тяжелых цепей разных изоформ иммуноглобулина. Также каждая тяжелая и легкая цепь содержит регулярно расположенные внутри цепей дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельную область (V_H), за которой следует ряд константных областей. Каждая легкая цепь имеет вари-

бельную область (V_L) на одном конце и константную область на его другом конце; константная область легкой цепи совпадает с первой константной областью тяжелой цепи, и переменная область легкой цепи совпадает с переменной областью тяжелой цепи. Полагают, что определенные аминокислотные остатки образуют область раздела между переменными областями легкой и тяжелой цепей.

Термин "переменный" относится к тому факту, что определенные части переменных доменов значительно отличаются по последовательности среди антител. Переменные области сообщают специфичность связывания антигена. Однако переменность неравномерно распределена на протяжении переменных доменов антител. Она сконцентрирована в трех участках, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR) или гиперпеременными областями, в переменных доменах как легкой, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части переменных доменов называют каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелой и легкой цепей содержит четыре каркасные области (FR), в основном принимающих конфигурацию β -слоев, соединенных тремя гиперпеременными областями (CDR), которые образуют петли, связывающие и в некоторых случаях образующие часть β -слоистой структуры. Гиперпеременные области (CDR) в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством каркасных областей (FR) и с гиперпеременными областями (CDR) из другой цепи, внося вклад в образование антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al. (1991) NIH Publ. No. 91-3242, vol. I, pages 647-669). Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как связывание Fc-рецептора (FcR), участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности, иницирование комплементзависимой цитотоксичности и дегрануляция мастоцитов.

Термин "гиперпеременная область", при использовании здесь, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гиперпеременная область содержит аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (т.е. остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md.), и/или остатки из "гиперпеременной петли" (т.е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Clothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой другие остатки переменного домена, отличные от остатков гиперпеременной области, которые определены в настоящем документе.

"Фрагменты антител" содержат часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab, $F(ab')_2$ и Fv; диатела, линейные антитела (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 10:1057-1062); молекулы одноцепочечного антитела; и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител. Расщеплением антител папаином получают два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим участком, и остаточный "Fc"-фрагмент, обозначение которого отражает его способность к легкой кристаллизации. Обработкой антитела пепсином получают $F(ab')_2$ -фрагмент, который содержит два антиген-объединяющих участка и все еще способен к перекрестному связыванию антигена.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок узнавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В указанной конфигурации взаимодействуют три гиперпеременные области (CDR) каждого переменного домена, определяя антигенсвязывающий участок на поверхности димера V_H - V_L . В целом, шесть гиперпеременных областей (CDR) придают антителу специфичность в связывании антигена. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три гиперпеременные области (CDR), специфичные по отношению к антигену) обладает способностью узнавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный связывающий участок.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (C_{H1}) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена C_{H1} тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем документе является обозначением Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. Fab' фрагменты получают путем восстановления дисульфидного мостика тяжелой цепи $F(ab')_2$ фрагмента. Также известны и другие типы химического связывания фрагментов антитела.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулины), происходящих от позвоночных любого вида, могут быть отнесены к одному из двух явно выраженных типов, названных каппа (κ) и лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов человека: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из указанных иммуноглобулинов могут быть да-

лее разделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, соответствующие разным классам иммуноглобулинов, именуются соответственно альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов разных классов хорошо известны. Разные изотипы выполняют разные эффекторные функции. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека обладают активностью ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью).

Слово "метка", при использовании здесь, относится к детектируемому соединению или композиции, которую конъюгируют напрямую или опосредованно с антителом с получением "меченого" антитела. Метка может быть детектируемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которая является детектируемой.

Термин "приемлемый" или "фармацевтически приемлемый" применительно к препарату, композиции или ингредиенту, при использовании в данном изобретении, означает не оказывающий длительного вредного воздействия на общее состояние здоровья субъекта, подвергаемого лечению, или не подавляющий биологическую активность или свойства соединения и относительно нетоксичный.

Термин "агонист", используемый здесь, относится к соединению, присутствие которого обуславливает биологическую активность белка, схожую с биологической активностью, обусловленной присутствием природного лиганда белка, такого как, например Btk.

Термин "частичный агонист", используемый здесь, относится к соединению, присутствие которого обуславливает биологическую активность белка того же типа, что и биологическая активность белка, обусловленная присутствием природного лиганда белка, но более низкой величины.

Термин "антагонист", используемый здесь, относится к соединению, присутствие которого обуславливает уменьшение величины биологической активности белка. В определенных вариантах осуществления присутствие антагониста обуславливает полное ингибирование биологической активности белка, такого как, например, Btk. В определенных вариантах осуществления антагонист является ингибитором.

Термин "тирозинкиназа Брутона (Btk)", используемый здесь, относится к тирозинкиназе Брутона из *Homo sapiens* (человека), описанной, например, в патенте США № 6326469 (номер доступа в GenBank NP 000052).

Термин "гомолог тирозинкиназы Брутона", используемый здесь, относится к ортологам тирозинкиназы Брутона, например ортологам мыши (номер доступа в GenBank AAB47246), собаки (номер доступа в GenBank XP549139), крысы (номер доступа в GenBank NP_001007799), цыпленка (номер доступа в GenBank NP_989564) или полосатого данио (номер доступа в GenBank XP_698117), и гибридным белкам любого из упомянутых выше, которые проявляют киназную активность в отношении одного или более субстратов тирозинкиназы Брутона (например, пептидного субстрата, имеющего аминокислотную последовательность "AVLESEEELYSSARQ").

Термин "совместное введение" или "комбинированная терапия" и т.п., используемый здесь, означает введение выбранных терапевтических агентов одному пациенту и включает режимы лечения, при которых агенты вводят одинаковыми или различными путями введения одновременно или в разное время.

Термин "эффективное количество", используемый здесь, относится к достаточному количеству ингибирующего Btk агента или соединения ингибитора Btk, которое подлежит введению и приведет к увеличению или появлению в крови субпопуляции лимфоцитов (например, фармацевтическая циторедукция). Например, "эффективное количество" для диагностических и/или прогностических применений представляет собой количество композиции, включающей соединение, описанное здесь, требуемое для обеспечения клинически значимого уменьшения повышения или появления в крови субпопуляции лимфоцитов без появления нежелательных побочных эффектов. Соответствующее "эффективное количество" в каждом отдельном случае может быть определено с использованием методик, таких как исследование с увеличением дозы.

Термин "терапевтически эффективное количество", используемый здесь, относится к достаточному количеству агента или соединения, подлежащего введению, которое будет облегчать до некоторой степени один или более симптомов В-клеточного лимфопролиферативного заболевания (BCLD). Результатом может являться уменьшение и/или ослабление признаков, симптомов или причин BCLD, или любое другое желательное изменение биологической системы. Термин "терапевтически эффективное количество" включает, например, профилактически эффективное количество. "Эффективное количество" соединения, описанного здесь, представляет собой количество, эффективное для достижения желаемого фармакологического эффекта или терапевтического улучшения без появления нежелательных побочных эффектов. Следует понимать, что "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" может варьировать от субъекта к субъекту из-за изменения метаболизма соединения формулы (A), формулы (B), формулы (C) или формулы (D), возраста, веса, общего состояния субъекта, состояния, подлежащего лечению, степени тяжести состояния, подлежащего лечению, и заключения лечащего терапевта. В качестве примера только, терапевтически эффективные количества могут быть определены с помощью обычных экспериментов, включая, но без ограничения, клиническое исследование увеличения

дозы.

Термины "усиливать" или "усиление" означают увеличение или пролонгирование желаемого эффекта по активности или продолжительности действия. В качестве примера "усиление" эффекта терапевтических агентов относится к способности увеличивать или пролонгировать действие терапевтических агентов по активности или продолжительности в процессе лечения заболевания, нарушения или состояния. "Усиливающее эффективное количество", используемое здесь, относится к количеству, необходимому для усиления эффекта терапевтического агента при лечении заболевания, нарушения или состояния. При применении у пациента количества, эффективные для такого применения, будут зависеть от тяжести и течения заболевания, нарушения или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента и реакции на лекарственные средства, а также заключения лечащего врача.

Термин "гомологичный цистеин", используемый здесь, относится к цистеиновому остатку, находящемуся в некотором положении в последовательности, гомологичном цистеину 481 тирозинкиназы Брутона, как определено здесь. Например, цистеин 482 гомологичен цистеину ортолога тирозинкиназы Брутона крысы; цистеин 479 гомологичен цистеину ортолога цыпленка; и цистеин 481 гомологичен цистеину ортолога полосатого данио. В другом примере гомологичный цистеин ТХК, представитель семейства киназ Тес, близкого к тирозину Брутона, представляет собой Cys 350. См. также выравнивания последовательностей тирозинкиназ (ТК), опубликованные в Интернете по адресу kinase.com/human/kinome/phylogeny.html.

Термин "идентичный", используемый здесь, относится к двум или более одинаковым последовательностям или подпоследовательностям. Кроме того, термин "по существу идентичный", используемый здесь, относится к двум или более последовательностям, имеющим процентную долю одинаковых единиц последовательности при сравнении и выравнивании с получением максимального соответствия в пределах окна сравнения или обозначенной области, согласно оценке с помощью алгоритмов сравнения с использованием либо ручного выравнивания, либо визуальной проверки. В качестве примера только две или более последовательности могут быть "по существу идентичны", если единицы последовательности идентичны примерно на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% в пределах конкретной области. Такие проценты описывают "проценты идентичности" двух или более последовательностей. Идентичность последовательности может наблюдаться в пределах области длиной по меньшей мере около 75-100 единиц последовательности, в пределах области длиной примерно 50 единиц последовательности или, если не указано конкретно, в пределах целой последовательности. Это определение также относится к последовательности, комплементарной тестируемой. В качестве примера только две или более полипептидные последовательности идентичны, если составляющие их остатки аминокислот идентичны, а две или более полипептидные последовательности "по существу идентичны", если составляющие их остатки аминокислот идентичны примерно на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% в пределах конкретной области. Идентичность может наблюдаться в пределах области длиной по меньшей мере около 75-100 аминокислот, в пределах области длиной около 50 аминокислот или, если не указано конкретно, в пределах целой последовательности полипептида. Кроме того, только в качестве примера, две или более полинуклеотидные последовательности идентичны, если составляющие их остатки нуклеиновых кислот идентичны, тогда как две или более полинуклеотидные последовательности "по существу идентичны", если составляющие их остатки нуклеиновых кислот идентичны примерно на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% в пределах конкретной области. Идентичность может наблюдаться в пределах области, длина которой составляет по меньшей мере около 75-100 нуклеотидов, в пределах области, длина которой составляет примерно 50 нуклеотидов, или, если не указано конкретно, в пределах целой полинуклеотидной последовательности.

Термины "ингибирует", "ингибирующий" или "ингибитор" киназы, используемые здесь, относятся к ингибированию ферментативной фосфотрансферазной активности.

Термин "необратимый ингибитор", используемый здесь, относится к соединению, которое при контакте с целевым белком (например, киназой) вызывает образование новой ковалентной связи с белком или в пределах белка, в результате чего один или более видов биологической активности целевого белка (например, фосфотрансферазная активность) снижается или полностью подавляется независимо от последующего присутствия или отсутствия необратимого ингибитора.

Термин "необратимый ингибитор Btk", используемый здесь, относится к ингибитору Btk, который может образовывать ковалентную связь с аминокислотным остатком Btk. В одном варианте осуществления необратимый ингибитор Btk может образовывать ковалентную связь с остатком Cys Btk; в конкретных вариантах осуществления необратимый ингибитор может образовывать ковалентную связь с остатком Cys 481 (или его гомологом) Btk или цистеиновым остатком в гомологичном соответствующем положении другой тирозинкиназы.

Термин "изолированный", используемый здесь, относится к разделению и отделению представляющего интерес компонента от нецелевых компонентов. Изолированные вещества могут находиться в сухом или в полусухом состоянии, или в растворе, включая, но без ограничения, водный раствор. Изолированный компонент может находиться в гомогенном состоянии, или изолированный компонент может являться частью фармацевтической композиции, которая содержит дополнительные фармацевтически

приемлемые носители и/или вспомогательные вещества. В качестве примера только нуклеиновые кислоты или белки являются "изолированными", когда такие аминокислоты или белки свободны, по меньшей мере, от некоторых клеточных компонентов, с которыми они связаны в природном состоянии, или в том случае, если нуклеиновая кислота или белок были сконцентрированы в большей степени, по сравнению с исходной концентрацией нуклеиновой кислоты/белка при продукции *in vivo*. Также, в качестве примера, ген считается изолированным, когда он отделен от открытых рамок считывания, фланкирующих ген и кодирующих белки, отличные от белков, кодируемых представляющим интерес геном.

"Метаболит" соединения по данному описанию представляет собой производное соединения, которое образуется в процессе метаболизма этого соединения. Термин "активный метаболит" относится к биологически активному производному соединения, которое образуется в процессе метаболизма этого соединения. Используемый здесь термин "метаболизированный" относится к совокупности процессов (включая, но без ограничения, реакции гидролиза и реакции, катализируемые ферментами, такие как реакции окисления), при которых конкретное вещество изменяется в организме. Так, ферменты вызывают специфические структурные изменения соединения. Например, цитохром P450 катализирует ряд окислительных и восстановительных реакций, тогда как уридиндифосфат-глюкуронилтрансферазы катализируют перенос активированной молекулы глюкуроновой кислоты на ароматические спирты, алифатические спирты, карбоновые кислоты, амины и свободные сульфгидрильные группы. Дополнительную информацию о метаболизме можно найти в *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Edition, McGraw-Hill (1996). Метаболиты соединений по данному описанию могут быть идентифицированы либо путем введения соединений в организм хозяина и анализа образцов тканей хозяина, либо путем инкубации соединений с клетками печени *in vitro* и анализа полученных соединений. Оба способа хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления метаболиты соединений образуются в ходе окислительных процессов и соответствуют соответствующим гидроксисодержащим соединениям. В некоторых вариантах осуществления соединение метаболизируется в фармакологически активные метаболиты.

Термин "модулировать", используемый здесь, относится к взаимодействию с мишенью либо напрямую, либо опосредованно, для того, чтобы изменить активность мишени, включая, в качестве примера только, усиление активности мишени, ингибирование активности мишени, ограничение активности мишени или расширение диапазона активности мишени.

Термин "модулятор", используемый здесь, относится к соединению, которое изменяет активность молекулы. Например, модулятор может вызывать увеличение или уменьшение величины конкретного вида активности молекулы, по сравнению с величиной активности в отсутствие модулятора. В определенных вариантах осуществления модулятор представляет собой ингибитор, который снижает величину одного или более видов активности молекулы. В определенных вариантах осуществления ингибитор полностью предотвращает один или более видов активности молекулы. В определенных вариантах осуществления модулятор является активатором, который увеличивает величину по меньшей мере одного вида активности молекулы. В определенных вариантах осуществления присутствие модулятора приводит к появлению активности, которая не возникает в отсутствие модулятора.

Термин "селективно связывающее соединение", используемый здесь, относится к соединению, которое селективно связывается с любой частью одного или более белков-мишеней.

Термин "селективно связывается", используемый здесь, относится к способности селективно связывающегося соединения связываться с целевым белком, таким как, например, Btk, с аффинностью, превышающей аффинность его связывания с нецелевым белком. В определенных вариантах осуществления специфическое связывание относится к связыванию с мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере в 10, 50, 100, 250, 500, 1000 или более раз превышает аффинность его связывания с нецелевым белком.

Термин "селективный модулятор", используемый здесь, относится к соединению, которое селективно модулирует целевую активность по сравнению с нецелевой активностью. В определенных вариантах осуществления специфический модулятор относится к модулированию целевой активности по меньшей мере в 10, 50, 100, 250, 500, 1000 раз сильнее, чем нецелевой активности.

Термин "по существу очищенный", используемый здесь, относится к представляющему интерес компоненту, который может быть в значительной степени или, по существу, свободным от других компонентов, которые обычно сопутствуют или взаимодействуют с представляющим интерес компонентом до очистки. В качестве примера только представляющий интерес компонент может являться "в значительной степени очищенным", если композиция представляющего интерес компонента содержит менее чем около 30%, менее чем около 25%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 4%, менее чем около 3%, менее чем около 2%, менее чем около 1% (по сухому весу) загрязняющих компонентов. Таким образом, "в значительной степени очищенный" представляющий интерес компонент может иметь уровень чистоты примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или больше.

Термин "субъект", используемый здесь, относится к животному, которое является объектом лече-

ния, наблюдения или эксперимента. В качестве примера только, субъектом может являться, но без ограничения, млекопитающее, в том числе, но без ограничения, человек.

Термин "целевая активность", используемый здесь, относится к биологической активности, которую может модулировать селективный модулятор. Конкретные примеры целевых активностей включают, но без ограничения, аффинность связывания, сигнальную трансдукцию, ферментативную активность, опухолевый рост, эффекты на конкретные биомаркеры, относящиеся к В-клеточному лимфопролиферативному заболеванию.

Используемый здесь термин "целевой белок" относится к молекуле или части белка, с которой может связываться селективно связывающее соединение. В определенных вариантах осуществления целевым белком является Btk.

Термины "лечить", "лечение" или "терапия", используемые здесь, включают облегчение, уменьшение или ослабление заболевания или состояния, или его симптомов; управление заболеванием или состоянием, или его симптомами; предупреждение возникновения дополнительных симптомов; улучшение или предупреждение лежащих в основе метаболических причин симптомов; подавление развития заболевания или состояния, например купирование развития заболевания или состояния; смягчение заболевания или состояния; вызывание регрессии заболевания или состояния; смягчение состояния, вызванного заболеванием или состоянием; или задержку проявления симптомов заболевания или состояния. Термины "лечить", "лечение" или "терапия" включают, но без ограничения, профилактическое и/или терапевтическое лечение.

Как используется здесь, IC_{50} относится к количеству, концентрации или дозе конкретного тестируемого соединения, которое вызывает 50% ингибирование максимального ответа, например ингибирование Btk, в исследованиях по измерению такого ответа.

Как используется здесь, EC_{50} относится к дозе, концентрации или количеству конкретного тестируемого соединения, которое вызывает дозозависимый ответ при 50% от максимального проявления конкретного ответа, вызванного, спровоцированного или усиленного конкретным тестируемым соединением.

Гематологические злокачественные опухоли

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (a) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта и (c) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), высокого риска CLL или не-CLL/SLL лимфому. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фокулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток мантийной зоны, макроглобулинемию Вальденстрема, множественную миелому, лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, неберкитовскую В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности или экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток мантийной зоны. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый или хронический миелогенный (или миелоидный) лейкоз, миелодиспластический синдром или острый лимфобластный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) ABC-подтипа. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) GCB-подтипа. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема (WM). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому Беркитта. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой трансформированную фолликулярную лимфому. В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому маргинальной зоны.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (a) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное

- 18 -

включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

В-клеточные лимфопролиферативные нарушения (BCLD) представляют собой неоплазмы крови и охватывают, в числе прочего, неходжкинскую лимфому, множественную миелому и лейкоз. BCLD могут возникать в лимфатических тканях (как в случае лимфомы) или в костном мозге (как в случае лейкоза и миеломы), и все они связаны с неконтролируемым ростом лимфоцитов или белых клеток крови. Существует много подтипов BCLD, например хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и неходжкинская лимфома (NHL). Течение заболевания и лечение BCLD зависят от подтипа BCLD; однако даже в пределах каждого подтипа клиническая картина, морфологические признаки и ответ на терапию являются неоднородными.

Злокачественные лимфомы представляют собой неопластические трансформации клеток, которые располагаются преимущественно в лимфоидных тканях. Две группы злокачественных лимфом представляют собой лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому (NHL). Оба типа лимфом инфильтруют ретикулоэндотелиальные ткани. Однако они отличаются по неоплазматической клетке-предшественнице, участку заболевания, присутствию системных симптомов и ответу на лечение (Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas" Chapter 134, Cancer Medicine, (an approved publication of the American Cancer Society, B.C. Decker Inc., Hamilton, Ontario, 2003).

Неходжкинская лимфома

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения неходжкинской лимфомы у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой бортезомиб. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой бендамустин и ритуксимаб (BR).

Далее, в определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения рецидивирующей или рефрактерной неходжкинской лимфомы у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-она (т.е. PCI-32765/ибрутиниб). В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), рецидивирующую или рефрактерную лимфому из клеток мантийной зоны, или рецидивирующую или рефрактерную фолликулярную лимфому.

Неходжкинские лимфомы (NHL) представляют собой разнотипную группу злокачественных опухолей, преимущественно В-клеточного происхождения. NHL может развиваться в любых органах, связан-

ных с лимфатической системой, таких как селезенка, лимфатические узлы или миндалины, и может возникать в любом возрасте. NHL часто характеризуется увеличенными лимфатическими узлами, повышенной температурой и потерей массы тела. NHL классифицируется на В-клеточную или Т-клеточную NHL. Лимфомы, относящиеся к лимфопролиферативным заболеваниям после трансплантации костного мозга и стволовых клеток, как правило, представляют собой В-клеточную NHL. В схеме классификации (Working Formulation classification scheme) NHL подразделяется на категории низкой, промежуточной и высокой степени злокачественности на основании их естественной динамики (см. "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project," Cancer 49(1982):2112-2135). Лимфомы низкой степени злокачественности являются индолентными с медианой выживаемости от 5 до 10 лет (Hornig and Rosenberg (1984) N. Engl. J. Med. 311:1471-1475). Несмотря на то, что химиотерапия может индуцировать ремиссии у большинства индолентных лимфом, излечение происходит редко, и у большинства пациентов со временем рецидивирует, требуя дальнейшего лечения. Лимфомы промежуточной и высокой степени злокачественности являются более агрессивными опухолями, но они имеют больший шанс на излечение с помощью химиотерапии. Однако у значительной части этих пациентов будет рецидивировать и потребовать дальнейшего лечения.

Неограничивающий перечень В-клеточных NHL включает лимфому Беркитта (например, эндемическую лимфому Беркитта и спорадическую лимфому Беркитта), В-клеточную лимфому кожи, кожную лимфому клеток маргинальной зоны (MZL), диффузную крупноклеточную лимфому (DLBCL), диффузную смешанную мелко- и крупноклеточную лимфому, диффузную лимфому из мелких клеток с расщепленными ядрами, диффузную мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, экстранодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, фолликулярную мелкоклеточную с расщепленными ядрами лимфому (Степень 1), фолликулярную смешанную мелкоклеточную с расщепленными ядрами и крупноклеточную лимфому (Степень 2), фолликулярную крупноклеточную лимфому (Степень 3), внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, внутрисосудистый лимфоматоз, крупноклеточную иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому (LCL), лимфобластную лимфому, MALT-лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, лимфобластную лимфому из предшественников В-клеток, лимфому из клеток мантийной зоны, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны - лимфому ассоциированную со слизистой желудка лимфоидной ткани (MALT-лимфому), медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, нодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфоплазмочитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема и первичную лимфому центральной нервной системы (CNS). Дополнительные неходжкинские лимфомы предполагаются в рамках настоящего изобретения и очевидны для специалистов в данной области.

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL)

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения DLBCL у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (a) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (c) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществ-

вления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой леналидомид. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления второй терапией является темсиrolimus. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является бортезомиб.

Термин "диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL)", используемый здесь, относится к неоплазме В-лимфоцитов герминального центра с диффузной картиной роста и высоким средним значением индекса пролиферации. На долю DLBCL приходится приблизительно 30% всех лимфом, и может быть представлена несколькими морфологическими вариантами, включая центробластный, иммунобластный, богатый Т-клетками/гистиоцитами, анапластический и плазмобластный подтипы. Генетические тесты показали, что существуют различные подтипы DLBCL. Эти подтипы, по-видимому, имеют различные перспективы (прогнозы) и отвечают на лечение. DLBCL может поражать любую возрастную группу, но возникает в основном у пожилых людей (в среднем возрасте 60 лет).

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения (диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ABC-подтипа (ABC-DLBCL) у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинается после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой леналидомид. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления второй терапией является темсиrolimus. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является бортезомиб.

Предполагается, что ABC-подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ABC-DLBCL) происходит из В-клеток постгерминального центра, которые являются подавленными во время плазматической дифференциации. На долю ABC-подтипа DLBCL (ABC-DLBCL) приходится приблизительно 30% всех диагнозов DLBCL. ABC-подтип DLBCL считается наименее излечимым из молекулярных подтипов DLBCL и, таким образом, пациенты с диагнозом ABC-DLBCL обычно демонстрируют значительно пониженные коэффициенты выживаемости по сравнению с субъектами, имеющими другие типы DLBCL. ABC-DLBCL чаще всего ассоциирована с хромосомными транслокациями, дерегулирующими главный регулятор герминального центра BCL6, и с мутациями, инактивирующими ген PRDM1, который кодирует репрессор транскрипции, необходимый для дифференцировки плазматических клеток.

Особенно значимым сигнальным путем, участвующим в патогенезе ABC-DLBCL является путь, опосредованный комплексом транскрипционного ядерного фактора (NF)-кВ. Семейство NF-кВ включает 5 членов (p50, p52, p65, c-rel и RelB), которые формируют гомо- и гетеродимеры, и функционируют в качестве транскрипционных факторов для опосредования различных клеточных активностей, таких как пролиферация, апоптоз, воспалительные и иммунные ответ, и являются важными для нормального раз-

вития и выживания В-клеток. NF-κB широко используется эукариотическими клетками в качестве регулятора генов, которые контролируют пролиферацию клеток и выживание клеток. Таким образом, многие различные типы опухолей человека имеют изменения в регуляции NF-κB: иными словами, NF-κB является конститутивно активным. Активный NF-κB запускает экспрессию генов, которые контролируют клеточную пролиферацию и защищают клетки от состояний, которые в ином случае будут вызывать их гибель посредством апоптоза.

Зависимость ABC DLBCL от NF-κB обуславливается сигнальным путем "upstream" IκB-киназы, состоящим из CARD11, BCL10 и MALT1 (CBM-комплекс). Нарушение CBM пути подавляет передачу сигнала NF-κB в клетках ABC DLBCL и вызывает апоптоз. Молекулярные основы конститутивной активности пути NF-κB являются объектом настоящего исследования, но некоторые соматические изменения генома ABC DLBCL очевидно инициируют этот путь. Например, соматические мутации суперспирального участка (coiled-coil) CARD11 в DLBCL наделяют этот сигнальный каркасный белок способностью спонтанно инициировать белок-белковое взаимодействие с MALT1 и BCL10, вызывая активность IKK и активацию NF-κB. Конститутивная активность сигнального пути В-клеточного рецептора вовлечена в активацию NF-κB в ABC DLBCLs с CARD11 дикого типа, и это связано с мутациями в цитоплазматических хвостах субъединиц CD79A and CD79B В-клеточного рецептора. Онкогенные активирующие мутации в сигнальном адаптере MYD88 активируют NF-κB и суммируются с сигнализацией В-клеточного рецептора, обеспечивая выживание клеток ABC DLBCL. К тому же, инактивирующие мутации в отрицательном регуляторе A20 NF-κB пути возникают фактически исключительно в ABC DLBCL.

Разумеется, генетические изменения, поражающие множество компонентов сигнального пути NF-κB, были в последнее время идентифицированы более чем у 50% пациентов с ABC-DLBCL, при этом эти поражения вызывают конститутивную активацию NF-κB, тем самым способствуя росту лимфомы. Это включает мутации CARD11 (~10% случаев), лимфоцит-специфический цитоплазматический поддерживающий белок, который - вместе с MALT1 и BCL10 - формирует сигналосому BCR, которая переключает сигналы от рецепторов антигенов в "downstream" медиаторы активации NF-κB. Даже большая доля случаев (~30%) несет биаллельные генетические поражения, инактивирующие отрицательный регулятор A20 NF-κB. Кроме того, высокие уровни экспрессии целевых генов NF-κB наблюдались в образцах опухоли ABC-DLBCL. Смотри, например, U. Klein et al., (2008), *Nature Reviews Immunology* 8:22-23; R.E. Davis et al., (2001), *Journal of Experimental Medicine* 194:1861-1874; G. Lentz et al., (2008), *Science* 319:1676-1679; M. Compagno et al., (2009), *Nature* 459:712-721 и L. Srinivasan et al., (2009), *Cell* 139:573-586).

Клетки DLBCL подтипа ABC, такие как OCI-Ly10, имеют постоянную активную BCR сигнализацию и являются очень чувствительными к ингибиторам Btk, описанным здесь. Необратимые ингибиторы Btk, описанные здесь, эффективно и необратимо ингибируют рост OCI-Ly10 (EC₅₀ при непрерывном воздействии = 10 нМ, EC₅₀ 1 ч импульсное воздействие = 50 нМ). К тому же, индукция апоптоза, как показано активацией каспазы, проточной цитометрией с использованием Annexin-V и увеличением фракции суб-G0, наблюдается в OCI-Ly10. Как чувствительные, так и резистентные клетки экспрессируют Btk на сходных уровнях, и активный сайт Btk является полностью занятым ингибитором в тех и других клетках, как показано с использованием флуоресцентно-меченого зонда. Клетки OCI-Ly10, как показано, имеют постоянную активную передачу сигнала BCR к NF-κB, который дозозависимым образом ингибируется ингибиторами Btk, описанными здесь. Активность ингибиторов Btk в клеточных линиях, исследуемых здесь, также характеризовали путем сравнения профилей сигнальной трансдукции (Btk, PLCγ, ERK, NF-κB, AKT), профилей секреции цитокина и профилей экспрессии мРНК, как со стимуляцией BCR, так и без таковой, и наблюдали значительные различия в этих профилях, что позволило получить клинические биомаркеры, которые идентифицируют наиболее чувствительные к лечению ингибитором Btk популяции пациентов. Смотри патент США № 7711492 и Staudt et al., *Nature*, vol. 463, Jan. 7, 2010, pp. 88-92, содержание которых включено путем отсылки в полном объеме.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения (диффузной В-крупноклеточной лимфомы, GCB-подтип (GCB-DLBCL) у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (б) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В не-

которых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой леналидомид. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления второй терапией является темсиrolimus. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является бортезомиб.

Фолликулярная лимфома

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения фолликулярной лимфомы у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой леналидомид. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления второй терапией является темсиrolimus.

Термин "фолликулярная лимфома", используемый здесь, относится к любому из нескольких типов неходжкинской лимфомы, в которой лимфоматозные клетки кластеризованы в узелки или фолликулы. Использование термина "фолликулярная" обусловлено тенденцией клеток к росту в виде кольцевой или нодулярной картины в лимфатических узлах. Средний возраст для людей с этой лимфомой составляет примерно 60 лет.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/Мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL)

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения CLL или SLL у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления CLL или SLL является заболеванием высокого риска. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой бендамустин и ритуксимаб (BR). В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб (FCR). В некоторых вариантах осуществления второй терапией является офатумумаб. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является леналидомид.

Хронический лимфоцитарный лейкоз и мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (CLL/SLL) обычно рассматриваются как одно и то же заболевание с незначительно различающимися проявлениями. Место, где собираются раковые клетки, определяет их название, CLL или SLL. Когда раковые клетки в первую очередь обнаруживают в лимфатических узлах, структурах лимфатической системы, имеющих форму лимфской фасоли (система преимущественно из тонких сосудов, обнаруживаемых в теле человека), такая лимфома называется SLL. На долю SLL приходится примерно от 5 до 10% всех лимфом. Когда большинство раковых клеток находится в кровотоке и костном мозге, то такая лимфома называется CLL.

Обе, CLL и SLL, являются медленно развивающимися заболеваниями, хотя CLL, которая является гораздо более распространенной, имеет склонность к более медленному росту. Лечение CLL и SLL является одинаковым. Как правило, указанные лимфомы не считаются излечимыми с помощью стандартных терапий, но в зависимости от стадии и скорости роста заболевания, большинство пациентов живут дольше 10 лет. В некоторых случаях, со временем, эти медленно растущие лимфомы могут трансформироваться в более агрессивные типы лимфомы.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) является наиболее распространенным типом лейкоза. По имеющимся оценкам, 100760 людей в США живут с CLL или находятся в стадии ремиссии. Большинство (>75%) людей, впервые диагностированных с CLL, находятся в возрасте 50 лет. В настоящее время лечение CLL направлено скорее на контроль заболевания и его симптомов, чем на полное излечение. Лечение CLL проводят химиотерапией, лучевой терапией, биологической терапией или трансплантацией костного мозга. Лечение симптомов в некоторых случаях проводят хирургически (спленэктомическое удаление увеличенной селезенки) или лучевой терапией ("снятие набухания" опухших лимфатических узлов). Несмотря на то, что в большинстве случаев CLL прогрессирует медленно, это заболевание считается в целом неизлечимым. Определенные CLL классифицируются как CLL высокого риска. Как используется здесь, "CLL высокого риска" означает CLL, характеризующийся по меньшей мере одним из следующего: 1) 17p13-; 2) 11q22-; 3) немутированный статус IgVH вместе с ZAP-70+ и/или CD38+; или 4) трисомия 12.

Лечение CLL обычно назначают, когда клинические симптомы пациента или анализ крови указыва-

ет, что заболевание прогрессировало до точки, когда оно может оказывать пагубное влияние на качество жизни пациента.

Мелкоклеточный лимфоцитарный лейкоз (SLL) имеет сходство с CLL, описанным выше, и также представляет собой рак В-клеток. В SLL атипичные лимфоциты в основном поражают лимфатические узлы. Однако в CLL атипичные клетки в основном поражают кровь и костный мозг. Селезенка может быть поражена в обоих заболеваниях. На долю SLL приходится примерно 1 случай на 25 из всех случаев неходжкинской лимфомы. Она может возникать в любое время, с подросткового возраста до старшего возраста, но реже в возрасте до 50 лет. SLL считается индолентной лимфомой. Это означает, что заболевание прогрессирует очень медленно и пациенты могут прожить много лет после постановки диагноза. Однако у большинства пациентов диагностируют заболевание на поздней стадии, и хотя SLL хорошо отвечает на различные химиотерапевтические препараты, оно обычно считается неизлечимым. Хотя существует тенденция к более частому возникновению некоторых видов рака у одного пола или у другого, случаи и смертельные исходы по причине SLL равномерно распределены между мужчинами и женщинами. Средний возраст на момент постановки диагноза составляет 60 лет.

Хотя SLL является индолентным заболеванием, оно постоянно прогрессирует. Обычной картиной этого заболевания является высокая частота ответов на лучевую терапию и/или химиотерапию, с периодом ремиссии заболевания. После периода ремиссии через несколько месяцев или лет следует необратимый рецидив заболевания. Повторное лечение приводит повторному ответу, но заболевание снова будет возвращаться. Это означает, что хотя краткосрочный прогноз SLL является достаточно положительным, с течением времени многие пациенты развивают несовместимые с жизнью осложнения в результате рецидивирующего заболевания. Учитывая возраст субъектов, обычно диагностированных с CLL и SLL, в данной области существует потребность в простом и эффективном лечении заболевания с минимальными побочными эффектами, которые не осложняют качество жизни пациента. Настоящее изобретение выполняет эту давно ощущаемую потребность в данной области.

Лимфома из клеток мантийной зоны

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения лимфомы из клеток мантийной зоны у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления второй терапии является темсиrolimus.

Термин "лимфома из клеток мантийной зоны", используемый здесь, относится к подтипу В-клеточной лимфомы, возникающей из CD5-позитивных антиген-наивных В-клеток прегерминального центра, локализованных в мантийной зоне, которая окружает фолликулы с нормальными герминальными центрами. Клетки MCL обычно сверх-экспрессируют циклин D1 по причине t(11;14) хромосомной транслокации в ДНК. В частности, транслокация происходит в t(11;14)(q13;q32). Только около 5% лимфом представляют лимфому данного типа. Клетки имеют размер от маленького до среднего. Мужчины поражаются более часто. Средний возраст пациентов составляет 60 лет. Лимфома, как правило, является

широко распространенной при ее диагностике, с вовлечением лимфатических узлов, костного мозга и очень часто селезенки. Лимфома из клеток мантийной зоны представляет собой не очень быстро растущую лимфому, но является трудной для лечения.

В-клеточная лимфома маргинальной зоны

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения В-клеточной лимфомы маргинальной зоны у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Термин "В-клеточная лимфома маргинальной зоны", используемый здесь, относится к группе родственных В-клеточных злокачественных новообразований, которые охватывают лимфоидные ткани в маргинальной зоне, очаговую область снаружи фолликулярной мантийной зоны. На долю лимфом маргинальной зоны приходится примерно от 5 до 10% лимфом. Клетки в этих лимфомах выглядят маленькими под микроскопом. Существует 3 основных типа лимфом маргинальной зоны, включающие экстра-нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны, нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны и лимфому маргинальной зоны селезенки.

MALT-лимфома

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения MALT у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравне-

нию с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Термин "лимфома лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (MALT)", используемый здесь, относится к экстранодальным проявлениям лимфомы маргинальной зоны. Большинство MALT-лимфом имеют низкую степень злокачественности, хотя незначительное количество проявляется изначально как неходжкинская лимфома (NHL) средней степени или развивается из формы с низкой степенью злокачественности. Большинство MALT-лимфом возникает в желудке, и примерно 70% желудочных MALT-лимфом ассоциировано с инфекцией *Helicobacter pylori*. Некоторые цитогенетические нарушения были идентифицированы, наиболее распространенным является трисомия 3 или t(11;18). Многие из этих других MALT-лимфом также связаны с инфекциями бактериями или вирусами. Средний возраст пациентов с MALT-лимфомой составляет примерно 60 лет.

Нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения нодальной В-клеточной лимфомы маргинальной зоны у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Термин "нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны" относится к индолентной В-клеточной лимфоме, которая обнаруживается в основном в лимфатических узлах. Заболевание является редким и на его долю приходится только 1% от всех неходжкинских лимфом (NHL). Данная лимфома чаще всего диагностируется у пациентов старшего возраста, причем женщины являются в большей степени подверженными данному заболеванию, чем мужчины. Заболевание классифицируется как лимфома маргинальной зоны, так как мутации возникают в маргинальной зоне В-клеток. По причине ее локализации в лимфатических узлах, данное заболевание также классифицируется как нодальное.

В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения В-клеточной лимфомы маргинальной зоны селезенки у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах

осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Термин "В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки" относится к специфической В-мелкоклеточной лимфоме низкой степени, которая включена в классификацию Всемирной Организации здравоохранения. Отличительными признаками являются спленомегалия, умеренный лимфоцитоз с ворсинчатой морфологией, интрасинусоидальная картина вовлечения различных органов, в особенности костного мозга, и относительно индолентное течение. У незначительного числа пациентов наблюдается прогрессирование опухоли с увеличением бластических форм и агрессивного поведения. Молекулярные и цитогенетические исследования показали разнородные результаты, возможно из-за отсутствия стандартизированного диагностического критерия.

Лимфома Беркитта

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения лимфомы Беркитта у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (б) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекту. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Термин "лимфома Беркитта" относится к типу неходжкинской лимфомы (NHL), который обычно поражает детей. Данная лимфома представляет собой высоко агрессивный тип В-клеточной лимфомы,

который часто начинается и вовлекает части тела, отличные от лимфатических узлов. Несмотря на ее быстрорастущую природу, лимфома Беркетта часто излечивается современными интенсивными терапиями. Существует два широких типа лимфомы Беркетта - спорадический и эндемический варианты:

Эндемическая лимфома Беркетта: Заболевание поражает детей значительно в большей степени, чем взрослых и в 95% случаев относится к инфекции вирусом Эпштейна-Барра (EBV). Данная лимфома возникает преимущественно в экваториальной Африке, где примерно половина из всех раковых заболеваний детей представляют собой лимфому Беркетта. Характеристически, данная лимфома имеет высокий шанс вовлечения челюстной кости, довольно отличительный признак, который является редким в спорадической лимфоме Беркетта. В данную лимфому также обычно вовлечен желудок.

Спорадическая лимфома Беркетта: Спорадический тип является типом лимфомы Беркетта, которая поражает остальные регионы мира, включая Европу и Америку. И в данном случае, главным образом, это заболевание детей. Связь между вирусом Эпштейна-Барра (EBV) не является такой сильной, как в эндемическом варианте, хотя прямое свидетельство инфекции EBV присутствует у одного из пяти пациентов. В большей степени, чем лимфатические узлы, является вовлеченным желудок, который значительно поражен более чем у 90% детей. Вовлечение костного мозга более распространено, чем в спорадическом варианте.

Макроглобулинемия Вальденстрема

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения макроглобулинемии Вальденстрема у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (a) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (c) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин гидрохлорид, винкристин сульфат и преднизон (R-CHOP).

Термин "макроглобулинемия Вальденстрема", также известная как лимфоплазматическая лимфома, представляет собой рак, включающий подтип белых клеток крови, называемых лимфоцитами. Указанное заболевание характеризуется неконтролируемой клональной пролиферацией герминально дифференцированных В-лимфоцитов. Указанное заболевание также характеризуется клетками лимфомы, продуцирующими антитело, называемое иммуноглобулин М (IgM). IgM-антитела циркулируют в крови в больших количествах и вызывают сгущение жидкой фазы крови, наподобие сиропа. Это может привести к уменьшению кровотока во многие органы, что может вызвать проблемы со зрением (из-за слабой циркуляции в кровеносных сосудах на заднем отделе глаза) и неврологическим проблемам (таким как головная боль, головокружение и помрачнение сознания), вызванное слабым кровотоком в головном мозге. Другие симптомы могут включать утомляемость и слабость, а также склонность к легкому кровотечению. Лежащая в основе этиология остается полностью неясной, но ряд факторов риска были идентифицированы, включая локус bр21.3 на хромосоме 6. Существует от 2- до 3-кратный риск увеличения развития WM у людей с персональной историей аутоиммунных заболеваний с аутоантителами, и особенно повышенные риски, связанные с гепатитом, вирусом иммунодефицита человека и риккетсиозом.

Множественная миелома

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения миеломы у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий:

(а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления второй терапией является леналидомид.

Множественная миелома, также известная как ММ, миелома, миелома плазматических клеток, или как болезнь Калера (по имени Отто Калера), представляет собой рак белых клеток крови, известных как плазматические клетки. Тип В-клеток, плазматические клетки являются важной частью иммунной системы, ответственной за выработку антител у человека и других позвоночных. Они вырабатываются в костном мозге и переносятся по лимфатической системе.

Лейкоз

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения лейкоза у субъектов, нуждающихся в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (b) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации в периферической крови мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии происходит после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения в периферической крови концентрации мобилизованного множества клеток по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в пери-

ферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно определенного промежутка времени.

Лейкоз представляет собой рак крови или костного мозга, характеризующийся аномальным увеличением клеток крови, как правило, лейкоцитов (белых клеток крови). Лейкоз является широким понятием, охватывающим спектр заболеваний. Лейкоз подразделяется на острые и хронические формы: (i) острый лейкоз характеризуется быстрым увеличением незрелых клеток крови. Этот рост делает костный мозг неспособным вырабатывать здоровые клетки крови. При остром лейкозе требуется немедленное лечение из-за быстрого прогрессирования и накопления злокачественных клеток, которые затем входят в кровоток и распространяются в другие органы тела. Острые формы лейкоза являются самыми распространенными формами лейкоза у детей; (ii) хронический лейкоз отличается избыточным образованием относительно зрелых, но все еще аномальных белых клеток крови. Обычно требуются месяцы или годы для прогрессирования, клетки продуцируются с гораздо более высокой скоростью, чем нормальные клетки, что приводит к образованию большого количества аномальных лейкоцитов в крови. Хронический лейкоз в основном возникает у пожилых людей, но может теоретически возникать в любой возрастной группе. Кроме того, заболевания подразделяются в соответствии с видом пораженных клеток крови. Это позволяет разделить лейкоз на лимфобластный или лимфоцитарный лейкоз, и миелоидный или миелогенный лейкоз: (i) лимфобластный или лимфоцитарный лейкоз, злокачественное изменение, которое происходит в типе клетки костного мозга, который обычно функционирует с образованием лимфоцитов, которые представляют собой клетки иммунной системы, сражающиеся против инфекции; (ii) миелоидный или миелогенный лейкоз, раковое изменение, которое происходит в типе клетки костного мозга, который в нормальном состоянии функционирует с образованием красных клеток крови, некоторых других типов лимфоцитов и тромбоцитов.

В пределах этих основных категорий, существует несколько подкатегорий, включая, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CML) и волосатоклеточный лейкоз (HCL).

Ингибиторы Btk

Также, в настоящем документе представлены способы лечения рака, такого как, в качестве примера только, BCLD, у субъекта, при этом субъект получал лечение путем введения ингибитора Btk. В следующем описании соединений необратимого ингибитора Btk, пригодных для применения в описанных здесь способах, определения упоминаемых стандартных химических терминов, можно найти в различных источниках (если иное не указано), в том числе Carey and Sundberg "Advanced Organic Chemistry 4th Ed." Vols. A (2000) and B (2001), Plenum Press, New York. Если не указано иначе, стандартные методы масс-спектропии, ЯМР, ВЭЖХ, химии белков, биохимии, технологий рекомбинантной ДНК и фармакологии, применяются в пределах компетенции специалиста в данной области. Кроме того, нуклеотидные и аминокислотные последовательности для Btk (например, человеческой Btk) известны в данной области и описаны, например, в патенте США № 6326469. Если не представлены точные определения, номенклатура, а также описанные здесь лабораторные процедуры и методы, относящиеся к аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, соответствуют общепринятым в данной области. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, формулирования и доставки фармацевтических препаратов, а также лечения пациентов могут быть использованы стандартные методики.

Соединения ингибитора Btk, описанные здесь, являются селективными в отношении Btk и киназы, имеющих цистеиновый остаток в положении аминокислотной последовательности тирозинкиназы, который гомологичен положению цистеина 481 в аминокислотной последовательности в Btk. Как правило, соединение необратимого ингибитора Btk, используемое в способах, описанных здесь, идентифицируют или характеризуют в анализе *in vitro*, например, биохимическом анализе в бесклеточной системе или функциональном анализе в клеточной системе. Такие способы анализа применяются для определения *in vitro* IC₅₀ для соединения необратимого ингибитора Btk.

Например, анализ киназы в бесклеточной системе может быть использован для определения активности Btk после инкубации киназы в отсутствие или в присутствии диапазона концентраций кандидатного соединения необратимого ингибитора Btk. Если кандидатное соединение действительно является необратимым ингибитором Btk, киназная активность Btk не будет восстановлена путем повторной промывки средой, не содержащей ингибитор. См., например, J. B. Smaill, et al. (1999), J. Med. Chem. 42(10): 1803-1815. Кроме того, образование ковалентного комплекса между Btk и кандидатным необратимым ингибитором Btk является эффективным индикатором необратимого ингибирования Btk, которое может быть легко определено с помощью ряда способов, известных в данной области (например, масс-спектрометрия). Например, некоторые соединения необратимого ингибитора Btk могут образовывать ковалентную связь с Cys 481 Btk (например, посредством реакции Михаэля).

Функциональные анализы ингибирования Btk в клеточной системе включают измерение одной или более клеточных конечных точек в ответ на стимулирование Btk-опосредованного сигнального пути в

клеточной линии (например, активация BCR в клетках Рамоса (Ramos cells)) в отсутствие или в присутствии диапазона концентраций кандидатного соединения необратимого ингибитора Btk. Полезные конечные точки для определения ответа на активацию BCR включают, например, аутофосфорилирование Btk, фосфорилирование белка-мишени Btk (например, PLC- γ), и поток цитоплазматического кальция.

Высокопроизводительные анализы для многих биохимических анализов в бесклеточной системе (например, анализов киназной активности) и функциональных анализов в клеточной системе (например, кальциевого потока) хорошо известны специалистам в данной области. Кроме того, коммерчески доступны системы высокопроизводительного скрининга (см., например, Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.). Эти системы, как правило, автоматизируют все процедуры, включая пипетирование всех образцов и реагентов, дозирование жидкостей, инкубацию в течение заданного промежутка времени и конечные считывания микропланшета в детекторе(ах), подходящем для анализа. Таким образом, автоматизированные системы обеспечивают идентификацию и определение характеристик большого числа соединений необратимого ингибитора Btk без лишних усилий.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk выбран из группы, состоящей из малой органической молекулы, макромолекулы, пептида или не пептида.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, обеспеченный здесь, представляет собой обратимый или необратимый ингибитор. В определенных вариантах осуществления ингибитор Btk представляет собой необратимый ингибитор.

В некоторых вариантах осуществления необратимый ингибитор Btk образует ковалентную связь с цистеиновой боковой цепью тирозинкиназы Брутона, гомологом тирозинкиназы Брутона или цистеиновым гомологом тирозинкиназы Btk.

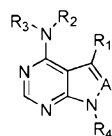
Соединения необратимого ингибитора Btk можно использовать для изготовления лекарственных препаратов для лечения любого из описанных выше патологических состояний (например, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, аллергических нарушений, В-клеточных пролиферативных заболеваний или тромбоэмболических нарушений).

В некоторых вариантах осуществления соединение необратимого ингибитора Btk, используемое в описанных здесь способах, ингибирует киназную активность Btk или гомолога Btk с IC_{50} *in vitro* меньше чем 10 мкМ (например, меньше чем 1 мкМ, меньше чем 0.5 мкМ, меньше чем 0.4 мкМ, меньше чем 0.3 мкМ, меньше чем 0.1 мкМ, меньше чем 0.08 мкМ, меньше чем 0.06 мкМ, меньше чем 0.05 мкМ, меньше чем 0.04 мкМ, меньше чем 0.03 мкМ, меньше чем 0.02 мкМ, меньше чем 0.01 мкМ, меньше чем 0.008 мкМ, меньше чем 0.006 мкМ, меньше чем 0.005 мкМ, меньше чем 0.004 мкМ, меньше чем 0.003 мкМ, меньше чем 0.002 мкМ, меньше чем 0.001 мкМ, меньше чем 0.00099 мкМ, меньше чем 0.00098 мкМ, меньше чем 0.00097 мкМ, меньше чем 0.00096 мкМ, меньше чем 0.00095 мкМ, меньше чем 0.00094 мкМ, меньше чем 0.00093 мкМ, меньше чем 0.00092 мкМ или меньше чем 0.00090 мкМ).

В одном варианте осуществления соединение необратимого ингибитора Btk селективно и необратимо ингибирует активированную форму ее тирозинкиназы-мишени (например, фосфорилированную форму тирозинкиназы). Например, активированная Btk является трансфосфорилированной по тирозину 551. Таким образом, в данных вариантах осуществления необратимый ингибитор Btk ингибирует киназу-мишень в клетках сразу же после активации киназы-мишени событиями пути передачи сигнала.

В других вариантах осуществления ингибитор Btk, используемый в способах, описанных здесь, имеет структуру Формулы (A), Формулы (B), Формулы (C), Формулы (D), Формулы (E) или Формулы (F). Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтически приемлемые соли, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически активные метаболиты и фармацевтически приемлемые пролекарства таких соединений. Обеспечены фармацевтические композиции, которые включают, по меньшей мере, одно такое соединение или фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сольват, фармацевтически активный метаболит или фармацевтически приемлемое пролекарство такого соединения. В некоторых вариантах осуществления, когда соединения, описанные здесь, содержат окисляемый атом азота, атом азота может быть преобразован в N-оксид способами, хорошо известными в данной области. В определенных вариантах осуществления также обеспечены изомеры и химически защищенные формы соединений, имеющие структуру, представленную Формулой (A), Формулой (B), Формулой (C), Формулой (D), Формулой (E) или Формулой (F).

Формула (A) имеет следующий вид:



Формула (A)

в которой

A независимо выбран из N или CR₅;

R₁ представляет собой H, L₂-(замещенный или незамещенный алкил), L₂-(замещенный или незаме-

щенный циклоалкил), L₂-(замещенный или незамещенный алкенил), L₂-(замещенный или незамещенный циклоалкенил), L₂-(замещенный или незамещенный гетероцикл), L₂-(замещенный или незамещенный гетероарил) или L₂-(замещенный или незамещенный арил), где L₂ представляет собой связь, O, S, -S(=O), -S(=O)₂, C(=O), -(замещенный или незамещенный C₁-C₆ алкил) или -(замещенный или незамещенный C₂-C₆ алкенил);

R₂ и R₃ независимо выбраны из H, низшего алкила и замещенного низшего алкила;

R₄ представляет собой L₃-X-L₄-G, где

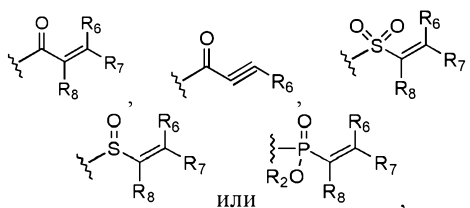
L₃ является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь, необязательно замещенный или незамещенный алкил, необязательно замещенный или незамещенный циклоалкил, необязательно замещенный или незамещенный алкенил, необязательно замещенный или незамещенный алкинил;

X является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь, O, -C(=O), S, -S(=O), -S(=O)₂, -NH, -NR₉, -NHC(O), -C(O)NH, -NR₉C(O), -C(O)NR₉, -S(=O)₂NH, -NHS(=O)₂, -S(=O)₂NR₉, -NR₉S(=O)₂, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -OC(O)NR₉-, -NR₉C(O)O-, -CH=NO-, -ON=CH-, -NR₁₀C(O)NR₁₀-, гетероарил, арил, -NR₁₀C(=NR₁₁)NR₁₀-, -NR₁₀C(=NR₁₁)-, -C(=NR₁₁)NR₁₀-, -OC(=NR₁₁)- или -C(=NR₁₁)O-;

L₄ является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл;

или L₃, X и L₄, взятые вместе, образуют содержащее азот гетероциклическое кольцо;

G представляет собой



где

R₆, R₇ и R₈ независимо выбраны из H, низшего алкила или замещенного низшего алкила, низшего гетероалкила или замещенного низшего гетероалкила, замещенного или незамещенного низшего циклоалкила и замещенного, или незамещенного низшего гетероциклоалкила;

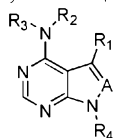
R₅ представляет собой H, галоген, -L₆-(замещенный или незамещенный C₁-C₃ алкил), -L₆-(замещенный или незамещенный C₂-C₄ алкенил), -L₆-(замещенный или незамещенный гетероарил) или -L₆-(замещенный или незамещенный арил), где L₆ представляет собой связь, O, S, -S(=O), S(=O)₂, NH, C(O), -NHC(O)O, -OC(O)NH, -NHC(O) или -C(O)NH;

каждый R₉ независимо выбран из H, замещенного или незамещенного низшего алкила и замещенного или незамещенного низшего циклоалкила;

каждый R₁₀ независимо представляет собой H, замещенный или незамещенный низший алкил, или замещенный или незамещенный низший циклоалкил; или

две группы R₁₀ могут вместе образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или R₉ и R₁₀ могут вместе образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или каждый R₁₁ независимо выбран из H, -S(=O)₂R₈, -S(=O)₂NH₂, -C(O)R₈, -CN, -NO₂, гетероарила или гетероалкила; и их фармацевтически активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В одном аспекте представлены соединения, имеющие структуру Формулы (A1)



Формула (A1)

в которой

A независимо выбран из N или CR₅;

R₁ представляет собой H, L₂-(замещенный или незамещенный алкил), L₂-(замещенный или незамещенный циклоалкил), L₂-(замещенный или незамещенный алкенил), L₂-(замещенный или незамещенный гетероцикл), L₂-(замещенный или незамещенный гетероарил) или L₂-(замещенный или незамещенный арил), где L₂ представляет собой связь, O, S, -S(=O), -S(=O)₂, C(=O), -(замещенный или незамещенный C₁-C₆ алкил) или -(замещенный или незамещенный C₂-C₆ алкенил);

R₂ и R₃ независимо выбраны из H, низшего алкила и замещенного низшего алкила;

R₄ представляет собой L₃-X-L₄-G, где

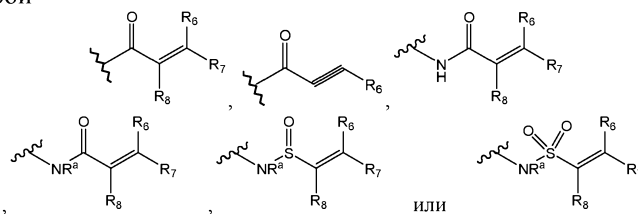
L_3 является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, гетероалкила, арила, гетероарила, алкиларила, алкилгетероарила или алкилгетероциклоалкила;

X является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь, O , $-C(=O)$, S , $-S(=O)$, $-S(=O)_2$, $-NH$, $-NR_9$, $-NHC(O)$, $-C(O)NH$, $-NR_9C(O)$, $-C(O)NR_9$, $-S(=O)_2NH$, $-NHS(=O)_2$, $-S(=O)_2NR_9$, $-NR_9S(=O)_2$, $-OC(O)NH$, $-NHC(O)O$, $-OC(O)NR_9$, $-NR_9C(O)O$, $-CH=NO$, $-ON=CH$, $-NR_{10}C(O)NR_{10}$, гетероарил, арил, $-NR_{10}C(=NR_{11})NR_{10}$, $-NR_{10}C(=NR_{11})$, $-C(=NR_{11})NR_{10}$, $-OC(=NR_{11})$ или $-C(=NR_{11})O$;

L_4 является необязательным и в случае присутствия представляет собой связь, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл;

или L_3 , X и L_4 , взятые вместе, образуют содержащее азот гетероциклическое кольцо или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, гетероалкила, арила, гетероарила, алкиларила, алкилгетероарила или алкилгетероциклоалкила;

G представляет собой



где R^a представляет собой H , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и каждый из R_7 и R_8 представляют собой H ;

R_6 представляет собой H , замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды, или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил);

R_6 и R_8 представляют собой H ;

R_7 представляет собой H , замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); или R_6 и R_8 , взятые вместе, образуют связь;

R_7 представляет собой H , замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); или

R_5 представляет собой H , $-L_6$ -(замещенный или незамещенный C_1 - C_3 алкил), $-L_6$ -(замещенный или незамещенный C_2 - C_4 алкенил), $-L_6$ -(замещенный или незамещенный гетероарил) или $-L_6$ -(замещенный или незамещенный арил), где L_6 представляет собой связь, O , S , $-S(=O)$, $S(=O)_2$, NH , $C(O)$, $-NHC(O)O$, $-OC(O)NH$, $-NHC(O)$ или $-C(O)NH$;

каждый R_9 независимо выбран из H , замещенного или незамещенного низшего алкила и замещенного или незамещенного низшего циклоалкила;

каждый R_{10} независимо выбран из H , замещенного или незамещенного низшего алкила, или замещенного или незамещенного низшего циклоалкила; или

две группы R_{10} могут вместе образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или

R_9 и R_{10} могут вместе образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или

каждый R_{11} независимо выбран из H , $-S(=O)_2R_8$, $-S(=O)_2NH_2$, $-C(O)R_8$, $-CN$, $-NO_2$, гетероарила или гетероалкила; и

их фармацевтически активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

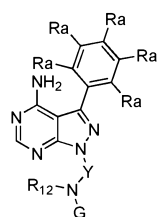
В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые соли соединений Формулы (A1). Только в качестве примера представлены соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, шавеле-

левая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота. Другие соли включают такие соли, в которых противоион представляет собой анион, такой как адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроидид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат и валерат. Дополнительные соли включают такие соли, в которых противоион представляет собой катион, такой как катионы натрия, лития, калия, кальция, магния, аммония и четвертичного аммония (замещенного, по меньшей мере, одной органической группой).

В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые сложные эфиры соединений формулы (A1), включая такие сложные эфиры, в которых сложноэфирная группа выбрана из формиата, ацетата, пропионата, бутирата, акрилата и этилсукцината.

В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые карбаматы соединений формулы (A1). В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые N-ацильные производные соединений формулы (A1). Примеры N-ацильных групп включают N-ацетильные и N-этоксикарбонильные группы.

В еще одном варианте осуществления соединение формулы (A) имеет следующую структуру формулы (B):



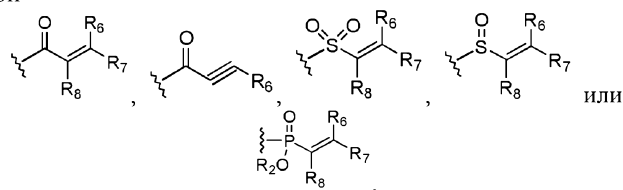
Формула (B)

в которой

Y представляет собой алкил или замещенный алкил, или 4-, 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо;

каждый R_a независимо представляет собой H, галоген, $-CF_3$, $-CN$, $-NO_2$, OH, NH_2 , $-L_a$ -(замещенный или незамещенный алкил), $-L_a$ -(замещенный или незамещенный алкенил), $-L_a$ -(замещенный или незамещенный гетероарил) или $-L_a$ -(замещенный или незамещенный арил), где L_a представляет собой связь, S, $-S(=O)$, $-S(=O)_2$, NH, C(O), CH_2 , $-NHC(O)O$, $-NHC(O)$ или $-C(O)NH$;

G представляет собой



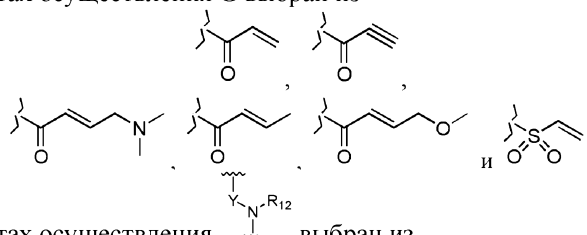
где

R_6 , R_7 и R_8 независимо выбраны из H, низшего алкила или замещенного низшего алкила, низшего гетероалкила или замещенного низшего гетероалкила, замещенного или незамещенного низшего циклоалкила, и замещенного или незамещенного низшего гетероциклоалкила;

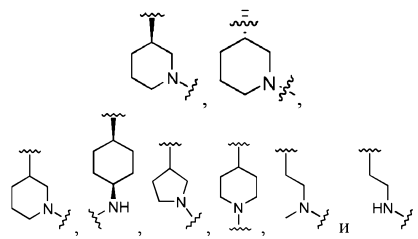
R_{12} представляет собой H или низший алкил или

Y и R_{12} , взятые вместе, образуют 4-, 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо; и его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

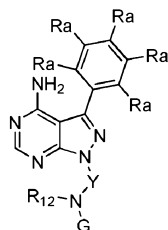
В еще других вариантах осуществления G выбран из



В еще других вариантах осуществления выбран из



В еще одном варианте осуществления соединение формулы (A1) имеет следующую структуру Формулы (B1):



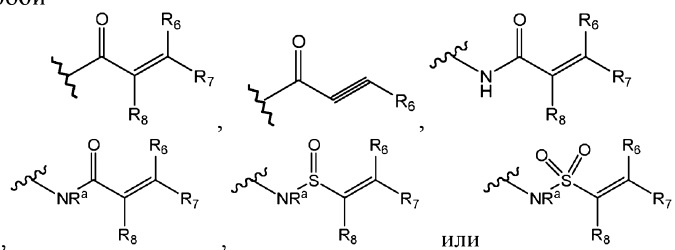
Формула (B1),

в которой:

Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкилена, гетероалкилена, арилена, гетероарилена, алкиленарилена, алкиленгетероарилена и алкиленгетероциклоалкилена;

каждый R_a независимо представляет собой H, галоген, $-CF_3$, $-CN$, $-NO_2$, OH, NH_2 , $-L_a$ -(замещенный или незамещенный алкил), $-L_a$ -(замещенный или незамещенный алкенил), $-L_a$ -(замещенный или незамещенный гетероарил) или $-L_a$ -(замещенный или незамещенный арил), где L_a представляет собой связь, O, S, $-S(=O)$, $-S(=O)_2$, NH, C(O), CH_2 , $-NHC(O)O$, $-NHC(O)$ или $-C(O)NH$;

G представляет собой



где R^a представляет

собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и каждый R_7 и R_8 представляют собой H;

R_6 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); R_6 и R_8 представляют собой H;

R_7 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); или R_6 и R_8 , взятые вместе, образуют связь;

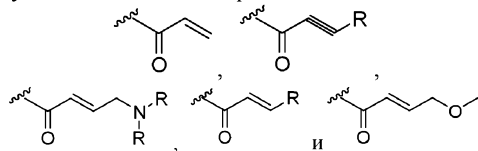
R_7 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфир, C_1 - C_8 алкиламиды или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил);

R_{12} представляет собой H или низший алкил; или

Y и R_{10} , взятые вместе, образуют 4-, 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо; и

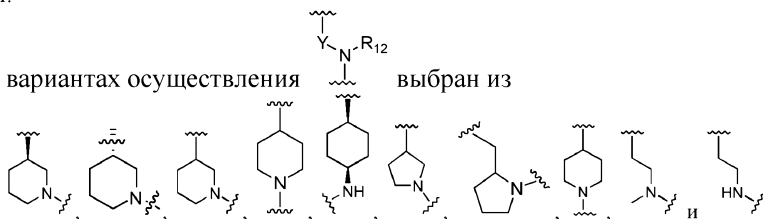
его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В еще других вариантах осуществления G выбран из

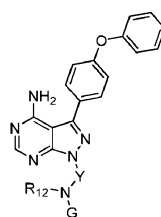


где R представляет собой H, алкил, алкилгидроксиль, гетероциклоалкил, гетероарил, алкилалкокси, алкилалкоксиалкил.

В еще других вариантах осуществления Y-N-R₁₂ выбран из



В еще одном варианте осуществления соединение формулы (B) имеет следующую структуру формулы (C):



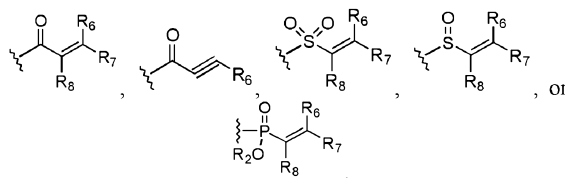
Формула (C)

Y представляет собой алкил или замещенный алкил, или 4-, 5- или 6-членное циклоалкильное кольцо;

R₁₂ представляет собой H или низший алкил; или

Y и R₁₂, взятые вместе, образуют 4-, 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

G представляет собой

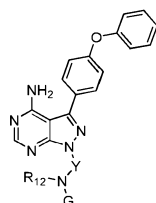


где

R₆, R₇ и R₈ независимо выбраны из H, низшего алкила или замещенного низшего алкила, низшего гетероалкила или замещенного низшего гетероалкила, замещенного или незамещенного низшего гетероциклоалкила; и

его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В еще одном варианте осуществления соединение формулы (B1) имеет следующую структуру формулы (C1):



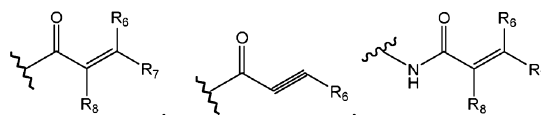
Формула (C1),

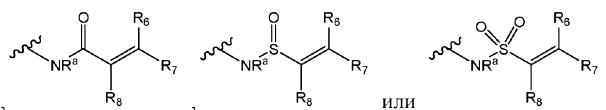
Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, гетероалкила, арила, гетероарила, алкиларила, алкилгетероарила и алкилгетероциклоалкила;

R₁₀ представляет собой H или низший алкил или

Y и R₁₀, взятые вместе, образуют 4-, 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

G представляет собой





где R^a представляет

собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и каждый из R₇ и R₈ представляют собой H;

R₆ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэфиры, C₁-C₈алкиламины или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил);

R₆ и R₈ представляют собой H;

R₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэфиры, C₁-C₈алкиламины или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил); или

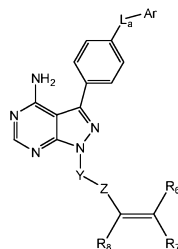
R₆ и R₈, взятые вместе, образуют связь;

R₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэфиры, C₁-C₈алкиламины или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил); и

его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В еще одном или альтернативном варианте осуществления группа "G" Формулы (A1), Формулы (B1) или Формулы (C1) представляет собой группу, которая применяется для варьирования физических и биологических свойств молекулы. Такое варьирование/модификации достигаются с использованием групп, которые модулируют химическую активность акцептора Михаэля, кислотность, основность, липофильность, растворимость и другие физические свойства молекулы. Физические и биологические свойства, модулированные такими модификациями группы G, включают, в качестве примера только, увеличение химической активности группы акцептора Михаэля, растворимости, *in vivo* абсорбции и *in vivo* метаболизма. Кроме того, *in vivo* метаболизм включает, в качестве примера только, регулирование *in vivo* PK свойств, нецелевые активности, возможные токсичности, связанные с взаимодействиями сурP450, межлекарственными взаимодействиями и т.п. Кроме того, модификации группы G позволяют варьировать *in vivo* эффективность соединения посредством модулирования, в качестве примера только, специфического и неспецифического белкового связывания с белками плазмы, и распределения *in vivo* в липидах и тканях.

В другом варианте осуществления в настоящем документе обеспечено соединение формулы (D). Формула (D) имеет следующую структуру:



Формула (D)

в которой

L_a представляет собой CH₂, O, NH или S;

Ar представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила;

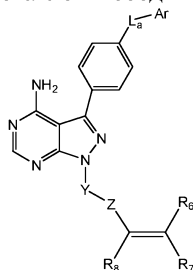
Z представляет собой C(=O), OC(=O), NHC(=O), C(=S), S(=O)_x, OS(=O)_x, NHS(=O)_x, где x равен 1 или 2;

R₆, R₇ и R₈, каждый, независимо выбран из H, замещенного или незамещенного C₁-C₄алкила, заме-

щенного или незамещенного C₁-C₄гетероалкила, замещенного или незамещенного C₃-C₆циклоалкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆гетероциклоалкила, C₁-C₆алкоксиалкила, C₁-C₈алкиламиноалкила, замещенного или незамещенного C₃-C₆циклоалкила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(арила), замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(гетероарила), замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(C₃-C₈циклоалкила) или замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкила); или

R₇ и R₈, взятые вместе, образуют связь; и его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В одном варианте осуществления представлены соединения, имеющие структуру формулы (D1)



Формула (D1)

в которой

L_a представляет собой CH₂, O, NH или S;

Ar представляет собой замещенный ароматический карбоцикл или ароматический гетероцикл;

Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкилена, гетероалкилена, арилена, гетероарилена, алкиленарилена, алкиленгетероарилена и алкиленгетероциклоалкилена или их комбинации;

Z представляет собой C(=O), NHC(=O), NR^aC(=O), NR^aS(=O)_x, где x равен 1 или 2, и R^a представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и каждый из R₇ и R₈ представляют собой H;

R₆ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэферы, C₁-C₈алкиламиды или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил);

R₆ и R₈ представляют собой H;

R₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэферы, C₁-C₈алкиламиды или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил); или

R₆ и R₈, взятые вместе, образуют связь;

R₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный C₁-C₄алкил, замещенный или незамещенный C₁-C₄гетероалкил, C₁-C₈алкиламиноалкил, C₁-C₈гидроксиалкиламиноалкил, C₁-C₈алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный C₁-C₈алкилC₃-C₆циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C₂-C₈гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C₁-C₄алкил(арил), C₁-C₄алкил(гетероарил), C₁-C₈алкилэферы, C₁-C₈алкиламиды или C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкил);

или их комбинации; и

его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые соли соединений Формулы (D1). Только в качестве примера, представлены соли аминокислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, и с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота. Другие соли включают такие соли, в которых противоион представляет собой анион, такой как адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, битурат, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентапропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюконогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеата малонат, метан-

сульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат и валерат. Еще другие соли включают соединения, в которых противоион представляет собой катион, такой как катионы натрия, лития, калия, кальция, магния, аммония и четвертичного аммония (замещенного, по меньшей мере, одной органической группой).

В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые сложные эфиры соединений формулы (D1), включая соединения, в которых сложноэфирная группа выбрана из формиата, ацетата, пропионата, бутирата, акрилата и этилсукцината.

В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые карбаматы соединений формулы (D1). В другом варианте осуществления представлены фармацевтически приемлемые N-ацильные производные соединений формулы (D1). Примеры N-ацильных групп включают N-ацетильную и N-этоксикарбонильную группы.

В еще одном варианте осуществления L_a представляет собой O.

В еще одном варианте осуществления Ag представляет собой фенил.

В еще одном варианте осуществления Z представляет собой $C(=O)$, $NHC(=O)$ или $NCH_3C(=O)$.

В еще одном варианте осуществления каждый из R_1 , R_2 и R_3 представляет собой H.

В одном варианте осуществления представлено соединение формулы (D1), в котором все из R_6 , R_7 и R_8 представляют собой H. В другом варианте осуществления не все из R_6 , R_7 и R_8 представляют собой H.

Для любого или всех вариантов осуществления заместители могут быть выбраны из подгруппы перечисленных альтернатив. Например, в некоторых вариантах осуществления L_a представляет собой CH_2 , O или NH. В других вариантах осуществления L_a представляет собой O или NH. В еще других вариантах осуществления L_a представляет собой O.

В некоторых вариантах осуществления Ag представляет собой замещенный или незамещенный арил. В еще других вариантах осуществления Ag представляет собой 6-членный арил. В некоторых других вариантах осуществления Ag представляет собой фенил.

В некоторых вариантах осуществления x равен 2. В еще других вариантах осуществления Z представляет собой $C(=O)$, $OC(=O)$, $NHC(=O)$, $S(=O)_x$, $OS(=O)_x$ или $NHS(=O)_x$. В некоторых других вариантах осуществления Z представляет собой $C(=O)$, $NHC(=O)$ или $S(=O)_2$.

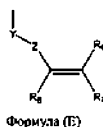
В некоторых вариантах осуществления R_7 и R_8 независимо выбраны из H, незамещенного C_1 - C_4 алкила, замещенного C_1 - C_4 алкила, незамещенного C_1 - C_4 гетероалкила и замещенного C_1 - C_4 гетероалкила; или R_7 и R_8 , взятые вместе, образуют связь. В еще других вариантах осуществления каждый из R_7 и R_8 представляет собой H; или R_7 и R_8 , взятые вместе, образуют связь.

В некоторых вариантах осуществления R_6 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_6 алкоксиалкил, C_1 - C_2 алкил- $N(C_1$ - C_3 алкил) $_2$, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_4 алкил(C_3 - C_8 циклоалкил) или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил). В некоторых других вариантах осуществления R_6 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_6 алкоксиалкил, C_1 - C_2 алкил- $N(C_1$ - C_3 алкил) $_2$, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_4 алкил(C_3 - C_8 циклоалкил) или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил). В еще других вариантах осуществления R_6 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, $-CH_2-O-(C_1-C_3$ алкил), $-CH_2-N(C_1-C_3$ алкил) $_2$, C_1 - C_4 алкил(фенил) или C_1 - C_4 алкил(5- или 6-членный гетероарил). В некоторых вариантах осуществления R_6 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, $-CH_2-O-(C_1-C_3$ алкил), $-CH_2-N(C_1-C_3$ алкил) $_2$, C_1 - C_4 алкил(фенил) или C_1 - C_4 алкил(5- или 6-членный гетероарил, содержащий 1 или 2 атома N), или C_1 - C_4 алкил(5- или 6-членный гетероциклоалкил, содержащий 1 или 2 атома N).

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, гетероалкила, циклоалкила и гетероциклоалкила. В других вариантах осуществления Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила, 4-, 5-, 6- или 7-членного циклоалкила, и 4-, 5-, 6- или 7-членного гетероциклоалкила. В еще других вариантах осуществления Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_1 - C_6 алкила, C_1 - C_6 гетероалкила, 5- или 6-членного циклоалкила, и 5- или 6-членного гетероциклоалкила, содержащего 1 или 2 атома N. В некоторых других вариантах осуществления Y представляет собой 5- или 6-членный циклоалкил, или 5- или 6-членный гетероциклоалкил, содержащий 1 или 2 атома N.

Любая комбинация групп, описанных выше для различных переменных, рассматривается в настоящем документе. При этом, заместители и паттерны замещения в соединениях, обеспеченных здесь, могут быть выбраны специалистом в данной области для получения соединений, которые являются химически стабильными и которые могут быть синтезированы с помощью методов, известных в данной области, а также с помощью методов, представленных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления необратимый ингибитор киназы имеет структуру формулы (E)



Формула (E)

в которой

представляет собой фрагмент, который связывается с активным центром киназы, включая тирозинкиназу, дополнительно включая цистеиновый гомолог Btk киназы;

Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкилена, гетероалкилена, арилена, гетероарилена, гетероциклоалкилена, циклоалкилена, алкиленарилена, алкиленгетероарилена, алкиленциклоалкилена и алкиленгетероциклоалкилена;

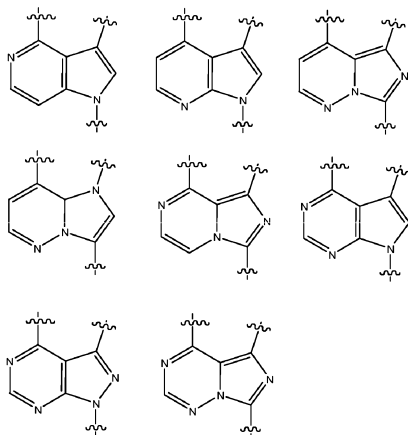
Z представляет собой C(=O), OC(=O), NHC(=O), NCH₂C(=O), C(=S), S(=O)_x, OS(=O)_x, NHS(=O)_x, где X равен 1 или 2;

R₆, R₇ и R₈, каждый, независимо выбран из H, замещенного или незамещенного C₁-C₄алкила, замещенного или незамещенного C₁-C₄гетероалкила, замещенного или незамещенного C₃-C₆циклоалкила, замещенного или незамещенного C₂-C₆гетероциклоалкила, C₁-C₆алкоксиалкила, C₁-C₈алкиламиноалкила, замещенного или незамещенного C₃-C₆циклоалкила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(арила), замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(гетероарила), замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(C₃-C₈циклоалкила) или замещенного или незамещенного C₁-C₄алкил(C₂-C₈гетероциклоалкила); или

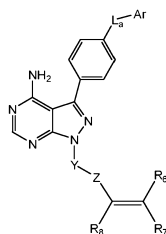
R₇ и R₈, взятые вместе, образуют связь; и

его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

В некоторых вариантах осуществления представляет собой замещенный конденсированный биарильный фрагмент, выбранный из



В одном аспекте в настоящем документе обеспечены соединения формулы (F). Формула (F) имеет следующий вид:



Формула (F)

в которой

L_a представляет собой CH₂, O, NH или S;

Ar представляет собой замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; и также

(a) Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкилена, гетероалкилена, арилена, гетероарилена, алкиленарилена, алкиленгетероарилена, алкиленциклоалкилена и алкиленгетероциклоалкилена;

Z представляет собой C(=O), NHC(=O), NR^aC(=O), NR^aS(=O)_x, где x равен 1 или 2, и R^a представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и также

(i) R₆, R₇ и R₈, каждый, независимо выбран из H, замещенного или незамещенного C₁-C₄алкила, за-

мещенного или незамещенного C_1 - C_4 гетероалкила, замещенного или незамещенного C_3 - C_6 циклоалкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 гетероциклоалкила, C_1 - C_6 алкоксиалкила, C_1 - C_8 алкиламиноалкила, замещенного или незамещенного C_3 - C_6 циклоалкила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(арила), замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(гетероарила), замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(C_3 - C_8 циклоалкила), или замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкила);

(ii) R_6 и R_8 представляют собой H;

R_7 представляет собой H, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфиры, C_1 - C_8 алкиламины или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); или

(iii) R_7 и R_8 , взятые вместе, образуют связь;

R_6 выбран из H, замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкила, замещенного или незамещенного C_1 - C_4 гетероалкила, замещенного или незамещенного C_3 - C_6 циклоалкила, замещенного или незамещенного C_2 - C_6 гетероциклоалкила, C_1 - C_6 алкоксиалкила, C_1 - C_8 алкиламиноалкила, замещенного или незамещенного C_3 - C_6 циклоалкила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(арила), замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(гетероарила), замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(C_3 - C_8 циклоалкила), или замещенного или незамещенного C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкила); или

(b) Y представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из циклоалкилена или гетероциклоалкилена; Z представляет собой $C(=O)$, $NHC(=O)$, $NR^aC(=O)$, $NR^aS(=O)_x$, где x равен 1 или 2, и R^a представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил; и также

(i) R_7 и R_8 представляют собой H;

R_6 представляет собой замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфиры, C_1 - C_8 алкиламины или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил);

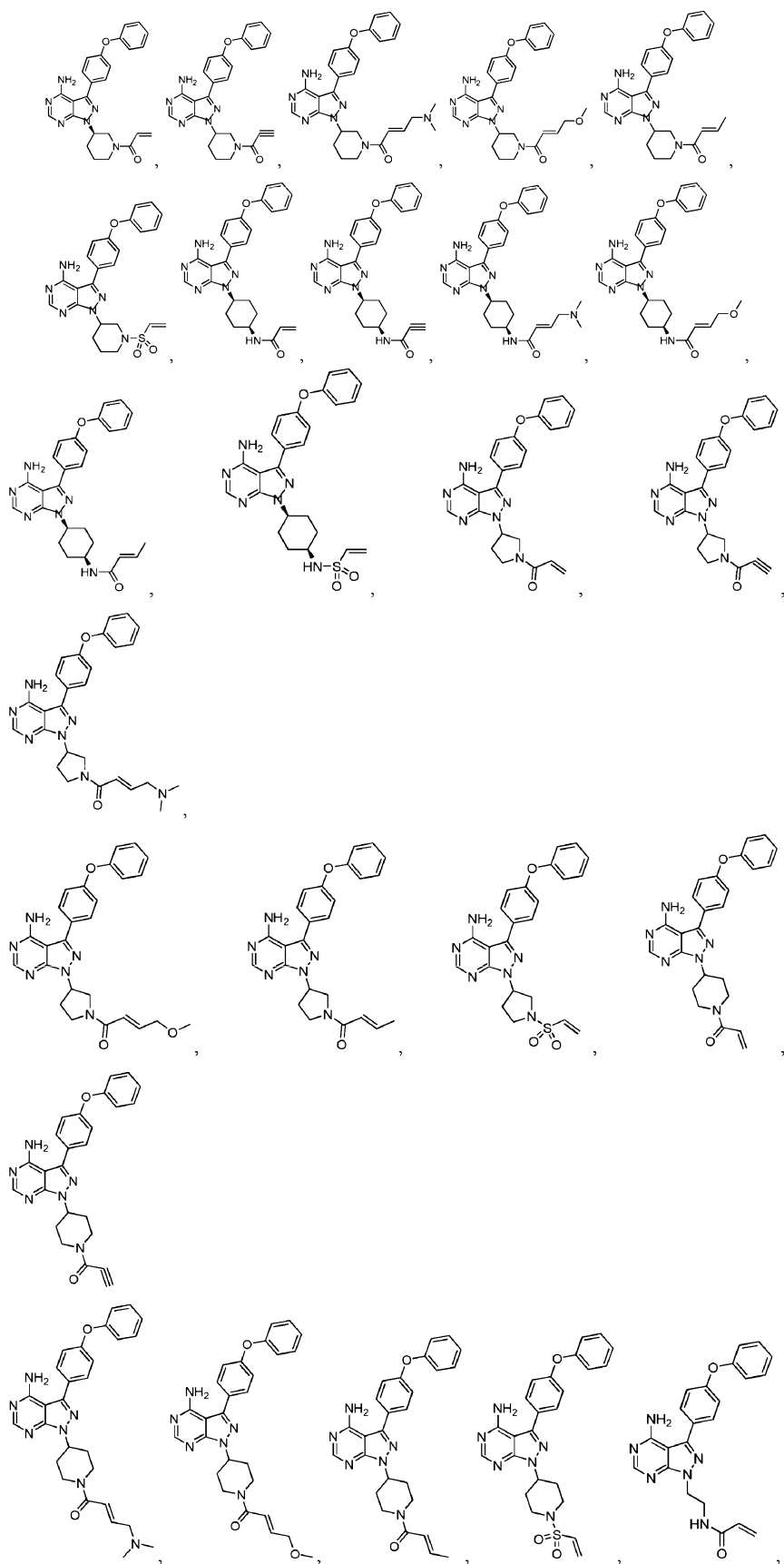
(ii) R_6 и R_8 представляют собой H;

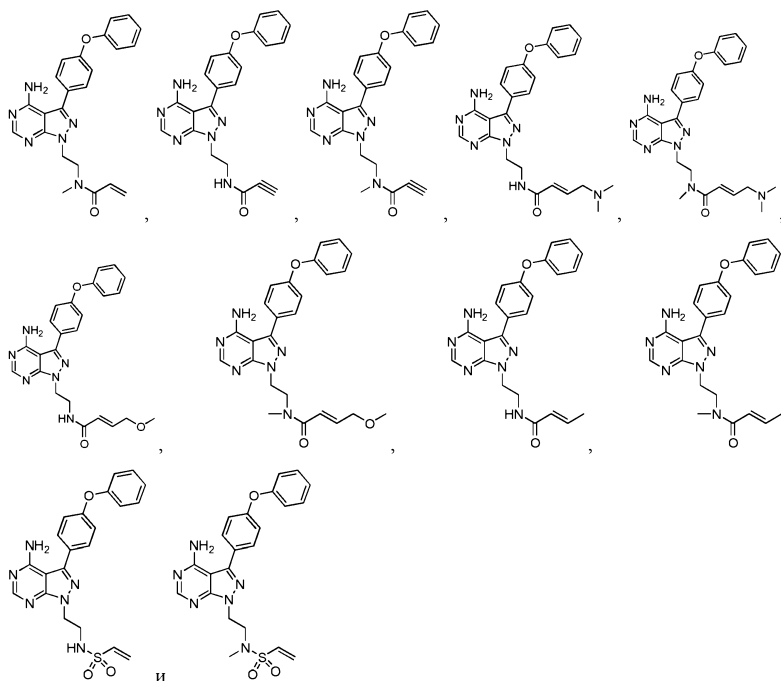
R_7 представляет собой замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфиры, C_1 - C_8 алкиламины или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); или

(iii) R_7 и R_8 , взятые вместе, образуют связь;

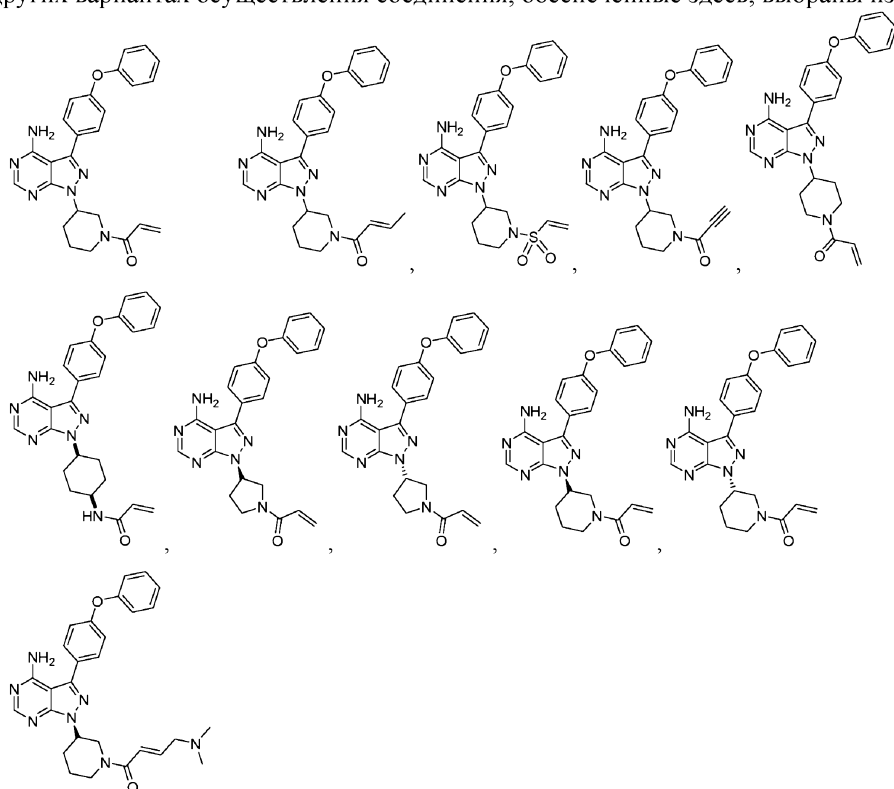
R_6 представляет собой замещенный или незамещенный C_1 - C_4 алкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_4 гетероалкил, C_1 - C_8 алкиламиноалкил, C_1 - C_8 гидроксиалкиламиноалкил, C_1 - C_8 алкоксиалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный C_1 - C_8 алкил C_3 - C_6 циклоалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный C_2 - C_8 гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, C_1 - C_4 алкил(арил), C_1 - C_4 алкил(гетероарил), C_1 - C_8 алкилэфиры, C_1 - C_8 алкиламины или C_1 - C_4 алкил(C_2 - C_8 гетероциклоалкил); и его фармацевтически приемлемые активные метаболиты, фармацевтически приемлемые сольваты, фармацевтически приемлемые соли или фармацевтически приемлемые пролекарства.

Еще другие варианты осуществления соединений формулы (A), формулы (B), формулы (C), формулы (D) включают, но без ограничения, соединения, выбранные из группы, состоящей из:





В еще других вариантах осуществления соединения, обеспеченные здесь, выбраны из:



В одном аспекте в настоящем документе обеспечено соединение, выбранное из следующих:

- 1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 4);
- (*E*)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)бут-2-ен-1-он (Соединение 5);
- 1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)сульфонил-этен (Соединение 6);
- 1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ин-1-он (Соединение 8);
- 1-(4-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 9);
- N*-((1*s*,4*s*)-4-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил)циклогексил)акриламид (Соединение 10);

1-((R)-3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 11);

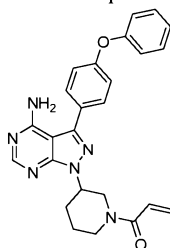
1-((S)-3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пирролидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 12);

1-((R)-3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 13);

1-((S)-3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d] пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (Соединение 14) и

(E)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)-4-(диметиламино)бут-2-ен-1-он (Соединение 15).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk имеет структуру:



В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d] пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (то есть PCI-32765/ибрутиниб).

В одном варианте осуществления ингибитор Btk представляет собой

α-циано-β-гидрокси-β-метил-N-(2,5-дибромфенил)пропенамид (LFM-A13),

AVL-101,

4-трет-бутил-N-(3-(8-(фениламино)имидазо[1,2-a]пиразин-6-ил)фенил)бензамид,

5-(3-амино-2-метилфенил)-1-метил-3-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)пиразин-2(1H)-он,

N-(2-метил-3-(4-метил-6-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)фенил)ацетамид,

4-трет-бутил-N-(2-метил-3-(4-метил-6-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)фенил)бензамид,

5-(3-(4-трет-бутилбензиламино)-2-метилфенил)-1-метил-3-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)пиразин-2(1H)-он,

5-(3-(3-трет-бутилбензиламино)-2-метилфенил)-1-метил-3-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)пиразин-2(1H)-он,

3-трет-бутил-N-(2-метил-3-(4-метил-6-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)фенил)бензамид,

6-трет-бутил-N-(2-метил-3-(4-метил-6-(4-(морфолин-4-карбонил)фениламино)-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)фенил) никотинамид, и терреиновую кислоту.

По всему описанию группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для получения стабильных фрагментов и соединений.

Получение Соединений

Соединения Формулы D могут быть синтезированы с использованием стандартных методов синтеза, известных специалистам в данной области, или с использованием способов, известных в данной области, в сочетании со способами, описанными в настоящем документе. Кроме того, растворители, температурные режимы и другие условия реакций, представленные здесь, могут изменяться специалистами в данной области. В качестве дополнительного руководства могут быть использованы следующие способы синтеза.

Реакции могут быть использованы в линейной последовательности для получения соединений, описанных здесь, или могут быть использованы для синтеза фрагментов, которые последовательно соединены с помощью способов, описанных здесь и/или известных в данной области.

Образование ковалентных связей с помощью реакции электрофила с нуклеофилом

Соединения, описанные здесь, могут быть модифицированы с использованием различных электрофилов или нуклеофилов для образования новых функциональных групп или заместителей. В табл. 1, озаглавленной "Примеры ковалентных связей и их предшественников" перечислены выбранные примеры ковалентных связей и функциональных групп предшественников, которые получают и могут быть использованы в качестве руководства по различным доступным комбинациям электрофилов и нуклеофилов. Функциональные группы-предшественники показаны как электрофильные группы и нуклеофильные группы.

Таблица 1. Примеры ковалентных связей и их предшественников

Продукт ковалентной связи	Электрофил	Нуклеофил
Карбоксамиды	Активированные сложные эфиры	Амины/анилины
Карбоксамиды	Ацилазиды	Амины/анилины
Карбоксамиды	Галогенангидриды	Амины/анилины
Сложные эфиры	Галогенангидриды	Спирты/фенолы
Сложные эфиры	Ацилнитрилы	Спирты/фенолы
Карбоксамиды	Ацилнитрилы	Амины/анилины
Имины	Альдегиды	Амины/анилины
Гидразоны	Альдегиды или кетоны	Гидразины
Оксимы	Альдегиды или кетоны	Гидроксиламины
Алкиламины	Алкилгалогениды	Амины/анилины
Сложные эфиры	Алкилгалогениды	Карбоновые кислоты
Тиозфиры	Алкилгалогениды	Тиолы
Сложные эфиры	Алкилгалогениды	Спирты/фенолы
Тиозфиры	Алкилсульфонаты	Тиолы
Сложные эфиры	Алкилсульфонаты	Карбоновые кислоты
Сложные эфиры	Алкилсульфонаты	Спирты/фенолы
Сложные эфиры	Ангидриды	Спирты/фенолы
Карбоксамиды	Ангидриды	Амины/анилины
Тиофенолы	Арилгалогениды	Тиолы
Ариламины	Арилгалогениды	Амины
Тиозфиры	Азидины	Тиолы
Боронатные эфиры	Боронаты	Гликоли
Карбоксамиды	Карбоновые кислоты	Амины/анилины
Сложные эфиры	Карбоновые кислоты	Спирты
Гидразины	Гидразиды	Карбоновые кислоты
N-ацилмочевины или ангидриды	Карбодиимиды	Карбоновые кислоты
Сложные эфиры	Диазоалканы	Карбоновые кислоты
Тиозфиры	Эпоксиды	Тиолы
Тиозфиры	Галогенацетиамиды	Тиолы
Аммотриазины	Галогентриазины	Амины/анилины
Триазиниловые эфиры	Галогентриазины	Спирты/фенолы
Амидины	Имидозфиры	Амины/анилины
Мочевины	Изоцианаты	Амины/анилины
Уретаны	Изоцианаты	Спирты/фенолы
Тиомочевины	Изотиоцианаты	Амины/анилины
Тиозфиры	Малеимиды	Тиолы
Фосфиты	Фосфорамидиты	Спирты
Силиловые эфиры	Силилгалогениды	Спирты
Алкиламины	Сложные сульфонатные эфиры	Амины/анилины
Тиозфиры	Сложные сульфонатные эфиры	Тиолы
Сложные эфиры	Сложные сульфонатные эфиры	Карбоновые кислоты
Сложные эфиры	Сложные сульфонатные эфиры	Спирты
Сульфонамиды	Сульфонилгалогениды	Амины/анилины
Сложные сульфонатные эфиры	Сульфонилгалогениды	Фенолы/спирты

Алкилтиол	α,β -ненасыщенный сложный эфир	Тиолы
Алкиловые эфиры	α,β -ненасыщенный сложный эфир	Спирты
Алкиламины	α,β -ненасыщенный сложный эфир	Амины
Алкилтиол	Винилсульфон	Тиолы
Алкиловые эфиры	Винилсульфон	Спирты
Алкиламины	Винилсульфон	Амины
Винилсульфид	Пропаргиламид	Тиолы

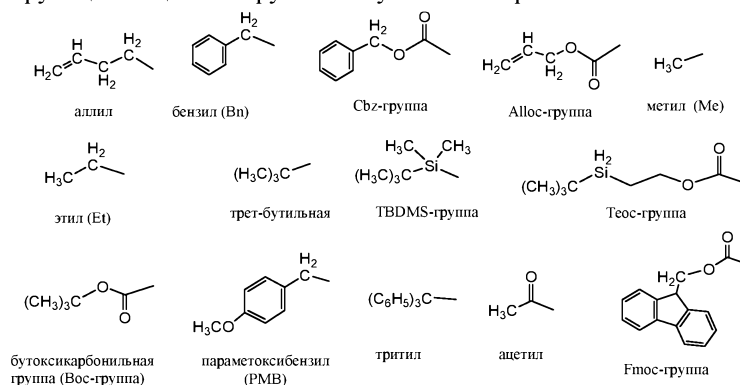
Использование защитных групп

В описанных реакциях может быть необходимой защита реакционноспособных функциональных групп, например, гидроксильных групп, аминогрупп, иминогрупп, тиогрупп или карбоксильных групп, где желательно их присутствие в конечном продукте, во избежание их нежелательного участия в реакциях. Защиту групп используют для того, чтобы блокировать некоторые или все реакционноспособные фрагменты и предотвратить участие таких групп в химических реакциях до удаления защитной группы. В одном варианте осуществления каждую защитную группу можно удалить отличным от других защитных групп способом. Защитные группы, которые отщепляются в полностью несовместимых условиях реакции, удовлетворяют требованию дифференциального удаления. Защитные группы могут быть удалены с помощью кислоты, основания и гидрогенолиза. Группы, такие как тритил, диметокситритил, ацеталь и трет-бутилдиметилсилил, кислотнеустойчивы и могут быть использованы для защиты реакционноспособных карбоксильных или гидроксильных групп в присутствии аминогрупп, защищенных карбо-бензоксигруппами (Cbz-группами), которые могут быть удалены путем гидрогенолиза, и флуоренилметоксикарбонильными группами (Fmoc-группами), которые неустойчивы к действию оснований. Реакционноспособные группы карбоновой кислоты и гидроксильные группы могут быть блокированы с помощью неустойчивых к действию оснований групп, таких как, но без ограничения, метил, этил и ацетил, в присутствии аминов, блокированных с помощью неустойчивых к действию кислот групп, таких как трет-бутилкарбамат, или с помощью карбаматов, которые устойчивы к действию кислот и оснований, но удаляются гидролитически.

Реакционноспособные группы карбоновых кислот и гидроксильные группы могут также быть блокированы удаляемыми при гидролизе защитными группами, такими как бензильная группа, тогда как аминогруппы, способные образовывать водородные связи с кислотами, могут быть блокированы группами, неустойчивыми к действию оснований, такими как Fmoc-группа. Реакционноспособные группы карбоновых кислот могут быть защищены путем превращения в соединения простого эфира, как приведено в качестве примера здесь, или могут быть блокированы удаляемыми путем окисления защитными группами, такими как 2,4-диметоксibenзил, тогда как совместно присутствующие аминогруппы могут быть блокированы неустойчивыми к действию фторидов силекарбаматами.

Аллильные блокирующие группы можно использовать в присутствии кислотных и основных защитных групп, так как последние стабильны и могут быть впоследствии удалены с помощью металлсодержащих или кислотных катализаторов. Например, защита аллил-блокированной карбоновой кислоты может быть снята с помощью Pd^0 -катализируемой реакции в присутствии основания ацетатной защитных групп амина. Еще одной формой защитной группы является смола, к которой может быть присоединено соединение или промежуточный продукт. Пока остаток присоединен к смоле, функциональная группа остается блокированной и не может вступать в реакцию. После высвобождения из смолы функциональная группа доступна для взаимодействия.

Типичные блокирующие/защитные группы могут быть выбраны из



Другие защитные группы и подробное описание методик, применимых для создания защитных групп и их удаления, описаны в Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999, и Kocienski, *Protective Groups*, Thieme Verlag, New York, NY, 1994, которые включены в настоящий документ посредством отсылки в полном объеме.

Другие формы соединений

Соединения, описанные здесь, могут обладать одним или более стереоцентрами, и каждый центр может существовать в R или S конфигурации. Соединения, представленные здесь, включают все диастереомерные, энантиомерные и эпимерные формы, а также их подходящие смеси. При желании, стереоизомеры могут быть получены способами, известными в данной области, например, разделением стереоизомеров с помощью хиральных хроматографических колонок.

Диастереомерные смеси могут быть разделены на их индивидуальные диастереомеры на основании их физико-химических различий с помощью известных способов, например с помощью хроматографии и/или фракционной кристаллизации. В одном варианте осуществления энантиомеры могут быть разделены с помощью хиральных хроматографических колонок. В других вариантах осуществления энантиомеры могут быть разделены путем преобразования энантиомерной смеси в диастереомерную с помощью реакции с подходящим оптически активным соединением (например, спиртом), разделения диастереомеров и превращения (например, гидролиза) индивидуальных диастереомеров в соответствующие чистые энантиомеры. Все такие изомеры, включая диастереомеры, энантиомеры и их смеси, рассматриваются как часть композиций, описанных в настоящем документе.

Способы и композиции, описанные здесь, включают применение N-оксидов, кристаллических форм (также известных как полиморфы) или фармацевтически приемлемых солей соединений, описанных здесь, а также активных метаболитов этих соединений, обладающих таким же типом активности. В некоторых случаях соединения могут существовать в виде таутомеров. Все таутомеры включены в объем соединений, описанных в настоящем документе. Кроме того, соединения, описанные здесь, могут существовать в несольватированной, а также в сольватированной формах с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Предполагается, что сольватированные формы соединений, представленных в настоящем документе, также раскрыты в настоящем документе.

Соединения Формулы D в неокисленной форме могут быть получены из N-оксидов соединений Формулы D путем обработки восстановителем, таким как, но без ограничения, сера, диоксид серы, трифенилфосфин, борогидрид лития, борогидрид натрия, трихлорид фосфора, трибромид фосфора или т.п., в пригодном инертном органическом растворителе, таком как, но без ограничения, ацетонитрил, этанол, водный диоксан или т.п., при температуре от 0 до 80°C.

В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные здесь, получают в форме пролекарств. «Пролекарство» относится к агенту, который превращается в родительское лекарственное средство *in vivo*. Пролекарства часто являются полезными, поскольку в некоторых ситуациях их легче ввести, чем родительское лекарственное средство. Пролекарства могут, например, быть биодоступными при пероральном введении, в то время как родительское лекарственное средство не является таковым. Пролекарство может также иметь улучшенную растворимость в фармацевтических композициях по сравнению с родительским лекарственным средством. Не ограничивающим примером пролекарства может быть соединение, описанное здесь, вводимое в форме сложного эфира («пролекарства») для облегчения передачи через клеточную мембрану, где растворимость в воде вредна для подвижности, но который затем проходит метаболический гидролиз с образованием карбоновой кислоты, активного вещества, после его попадания в клетку, где растворимость в воде является полезной. Еще другим примером пролекарства может являться короткий пептид (полиаминокислота), связанный с кислотной группой, при метаболизме которого происходит высвобождение активного фрагмента. В определенных вариантах осуществления при введении *in vivo* пролекарство химическим путем превращается в биологически, фармацевтически или терапевтически активную форму соединения. В определенных вариантах осуществления пролекарство метаболизируется под действием ферментов в ходе одной или более стадий или процессов в биологически, фармацевтически или терапевтически активную форму соединения. Для получения пролекарства фармацевтически активное соединение модифицируют таким образом, что активное соединение будет восстановлено при введении *in vivo*. Пролекарство может быть разработано для изменения метаболической стабильности или транспортных характеристик лекарственного средства, маскировки побочных эффектов или токсичности, для улучшения вкуса и запаха лекарственного средства, или для изменения других характеристик или свойств лекарственного средства. На основании знания фармакодинамических процессов и метаболизма лекарственного средства *in vivo*, специалисты в данной области могут разработать пролекарство соединения, если фармацевтически активное соединение известно (см., например, в Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392; Silverman (1992), *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc., San Diego, pages 352-401, Saulnier et al., (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 4, p. 1985).

Пролекарственные формы соединений, описанных здесь, где пролекарство подвержено метаболизму *in vivo* с образованием производного, как описано здесь, включены в объем формулы изобретения. В

некоторых случаях отдельные из описанных здесь соединений могут представлять собой пролекарство для другого производного или активного соединения.

Пролекарства часто являются полезными, поскольку в некоторых ситуациях их легче вводить, чем родительское лекарственное средство. Пролекарства, например, могут быть биодоступными при пероральном введении, в то время как родительское лекарственное средство таковым не является. Пролекарство может также иметь улучшенную растворимость в фармацевтических композициях по сравнению с родительским лекарственным средством. Пролекарства могут быть разработаны как обратимые производные лекарственного средства для применения в качестве модификаторов для усиления транспорта лекарственного средства в сайт-специфические ткани. В некоторых вариантах осуществления разработка пролекарства повышает эффективную растворимость в воде. См., например, Fedorak et al., *Am. J. Physiol.*, 269:G210-218 (1995); McLoed et al., *Gastroenterol.*, 106:405-413 (1994); Hochhaus et al., *Biomed. Chrom.*, 6:283-286 (1992); J. Larsen and H. Bundgaard, *Int. J. Pharmaceutics*, 37, 87 (1987); J. Larsen et al., *Int. J. Pharmaceutics*, 47, 103 (1988); Sinkula et al., *J. Pharm. Sci.*, 64:181-210 (1975); T. Higuchi and V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series; и Edward B. Roche, *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, все из которых включены в настоящий документ посредством отсылки в полном объеме.

Сайты на ароматической кольцевой части соединений Формулы D могут быть подвержены различным метаболическим реакциям, таким образом, введение подходящих заместителей в ароматические кольцевые структуры, таких как, в качестве примера только, галогены, может снижать, минимизировать или устранять этот метаболический путь.

Соединения, описанные здесь, включают меченные изотопами соединения, которые идентичны соединениям, указанным в различных формулах и структурах, представленных здесь, за исключением того факта, что один или более чем один атом заменен атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемого в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , соответственно. Определенные меченные изотопами соединения, описанные здесь, например те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , эффективны в анализе распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Кроме того, замещение изотопами, такими как дейтерий, то есть ^2H , может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенный период полувыведения *in vivo* или сниженные требования в отношении доз.

В дополнительных или других вариантах осуществления соединения, описанные здесь, подвержены метаболизму при введении в организм, нуждающийся в этом, с образованием метаболита, используемого затем для оказания желаемого эффекта, в том числе желаемого терапевтического эффекта.

Соединения, описанные здесь, могут быть получены и/или быть использованы в форме фармацевтически приемлемых солей. Типы фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения: (1) соли присоединения кислот, образованные при взаимодействии соединения в форме свободного основания с фармацевтически приемлемой неорганической кислотой, такой как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, метафосфорная кислота и т.п.; или органической кислотой, такой как уксусная кислота, пропионовая кислота, капроновая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, трифторуксусная кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, 3-(4-гидроксibenzoил)бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-этандисульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, толуолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-метилбиккло-2.2.2]окт-2-ене-1-карбоновая кислота, глюкогептоновая кислота, 4,4'-метиленбис-(3-гидрокси-2-ен-1-карбоновая кислота), 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, трет-бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтоиновая кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, муконовая кислота и т.п.; (2) соли, образованные при замене кислотного протона, присутствующего в родительском соединении, ионом металла, например ионом щелочного металла (например, лития, натрия, калия), ионом щелочно-земельного металла (например, магния или кальция), или ионом алюминия; или образует координационную связь с органическим основанием. Приемлемые органические основания включают этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, трометамин, N-метилглюкамин и т.п. Приемлемые неорганические основания включают гидроксид алюминия, гидроксид кальция, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид натрия и т.п.

Анализ и идентификацию соответствующих противоионов фармацевтически приемлемых солей можно выполнить с использованием различных методов, включая, но без ограничения, ионообменную хроматографию, ионную хроматографию, капиллярный электрофорез, индуктивно-связанную плазму, атомно-абсорбционную спектроскопию, масс-спектрометрию или любую их комбинацию.

Соли восстанавливают с использованием по меньшей мере одного из следующих методов: филь-

рации, осаждения с помощью осадителя с последующей фильтрацией, выпаривания растворителя или в случае водных растворов лиофилизации.

Следует понимать, что ссылка на фармацевтически приемлемые соли включает ее формы присоединения растворителя или кристаллические формы, в частности сольваты или полиморфы. Сольваты содержат либо стехиометрические, либо нестехиометрические количества растворителя и могут быть образованы в процессе кристаллизации с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Гидраты образуются в случае, когда растворителем является вода, и алкоголяты образуются в случае, когда растворителем является спирт. Сольваты соединений, описанных здесь, могут быть легко получены или образованы в способах, описанных здесь. Кроме того, соединения, обеспеченные здесь, могут существовать в несольватированных, а также сольватированных формах. В большинстве случаев в целях соединений и способов, обеспеченных здесь, сольватированные формы рассматривают как эквивалентные несольватированным формам.

Следует понимать, что ссылка на соль включает ее формы присоединения растворителя или кристаллические формы, в частности сольваты или полиморфы. Сольваты содержат либо стехиометрические, либо нестехиометрические количества растворителя и часто образуются в процессе кристаллизации с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Гидраты образуются в случае, когда растворителем является вода, и алкоголяты образуются в случае, когда растворителем является спирт. Полиморфы включают различные конфигурации укладки кристаллов одного и того же элементного состава соединения. Полиморфы, как правило, имеют разные картины дифракции рентгеновских лучей, разные инфракрасные спектры, температуры плавления, плотность, твердость, форму кристаллов, оптические и электрические свойства, стабильность и растворимость. Различные факторы, такие как растворитель для рекристаллизации, скорость кристаллизации и температура хранения, могут привести к доминированию одной кристаллической формы.

Соединения, описанные здесь, могут быть представлены в различных формах, включая, но без ограничения, аморфные формы, измельченные формы и формы наночастиц. Кроме того, соединения, описанные здесь, включают кристаллические формы, также известные как полиморфы. Полиморфы включают различные конфигурации укладки кристаллов одного и того же элементного состава соединения. Полиморфы, как правило, имеют разные картины дифракции рентгеновских лучей, разные инфракрасные спектры, температуры плавления, плотность, твердость, форму кристаллов, оптические и электрические свойства, стабильность и растворимость. Различные факторы, такие как растворитель рекристаллизации, скорость кристаллизации и температура хранения, могут привести к доминированию одной кристаллической формы.

Скрининг и описание фармацевтически приемлемых солей, полиморфов и/или сольватов могут быть проведены с применением множества методик, включая, но без ограничения, термический анализ, дифракцию рентгеновских лучей, спектроскопию, сорбцию пара и микроскопию. Методы термического анализа направлены на термохимическую деградацию или термофизические процессы, включая, но без ограничения, полиморфные превращения, и такие способы применяют для анализа взаимосвязи различных полиморфных форм, для определения потери массы, для установления температуры стеклования или для исследований совместимости вспомогательных веществ. Такие способы включают, но без ограничения, дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), модулированную дифференциальную сканирующую калориметрию (MDCS), термогравиметрический анализ (TGA) и термогравиметрический анализ и инфракрасную спектроскопию (TG/IR). Способы дифракции рентгеновских лучей включают, но без ограничения, дифрактометры на монокристалле и порошковые дифрактометры, и источники синхротронного излучения. Различные используемые спектроскопические методики включают, но без ограничения, спектроскопию комбинационного рассеяния света, инфракрасную спектроскопию на основе преобразования Фурье (FTIR), спектроскопию в видимой и ультрафиолетовой части спектра (UVIS) и ядерный магнитный резонанс (NMR) (жидко- или твердотельный). Различные микроскопические методики включают, но без ограничения, микроскопию в поляризованном свете, сканирующую электронную микроскопию (SEM) с энергорассеивающим рентгеновским анализом (EDX), сканирующую электронную микроскопию в режиме "естественной среды" с EDX (в газовой атмосфере или атмосфере водяного пара), инфракрасную микроскопию (IR-микроскопию) и микроскопию с комбинационным рассеянием.

В данном описании все описанные группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для обеспечения стабильных групп и соединений.

Фармакокинетика

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение второй терапии у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления на день 1 максимальная концентрация в плазме ($C_{\max}$) ингибитора Btk составила между 40 мг/мл и 400 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления на день 1 $C_{\max}$ ингибитора Btk составила между 44 мг/мл и 390 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления на день 1

2330 нг·ч/мл. В некоторых вариантах осуществления стационарная (steady state) AUC_{0-24} ингибитора Btk в дозе 12.5 мг/кг составляет 2936 нг·ч/мл. В некоторых вариантах осуществления стационарная (steady state) AUC_{0-24} ингибитора Btk в дозе 560 мг составляет 1553 нг·ч/мл.

В некоторых вариантах осуществления несвязанная фракция ингибитора Btk колеблется между 1 и 5%. В некоторых вариантах осуществления несвязанная фракция ингибитора Btk колеблется между 1.5 и 4%. В некоторых вариантах осуществления несвязанная фракция ингибитора Btk колеблется между 2 и 3%. В некоторых вариантах осуществления несвязанная фракция ингибитора Btk составляет 2.5%.

Вторые терапии

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk; и (б) проведение второй терапии у субъекта. Кроме того, в определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (а) проведение первой терапии у субъекта, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; (б) анализ мобилизованного множества клеток в образце, полученном от субъекта; и (с) проведение второй терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего понижения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с концентрацией до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение второй терапии после повышения концентрации мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает подсчет числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления проведение второй терапии начинают после последующего уменьшения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления анализ мобилизованного множества клеток включает измерение продолжительности увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови по сравнению с числом до введения ингибитора Btk. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение второй терапии после увеличения числа мобилизованного множества клеток в периферической крови в течение предварительно установленного промежутка времени.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора Btk до второй терапии уменьшает иммуноопосредованные реакции на вторую терапию. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора Btk до офатумумаба уменьшает иммуноопосредованные реакции на офатумумаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает химиотерапевтический агент, стероид, иммунотерапевтический агент, таргетную терапию или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает ингибитор пути В-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути В-клеточного рецептора представляет собой ингибитор CD79A, ингибитор CD79B, ингибитор CD19, ингибитор Lyn, ингибитор Syk, ингибитор PI3K, ингибитор Blnk, ингибитор PLC γ , ингибитор PKC β или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает антитело, ингибитор передачи сигнала от В-клеточного рецептора, ингибитор PI3K, ингибитор IAP, ингибитор mTOR, радиоиммунотерапевтическое средство, ДНК-повреждающий агент, ингибитор протеасом, ингибитор гистондеацетилазы, ингибитор протеинкиназы, ингибитор белка гэджехог (hedgehog), ингибитор Hsp90, ингибитор теломеразы, ингибитор Jak1/2, ингибитор протеазы, ингибитор PKC, ингибитор PARP или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает хлорамбуцил, ифосфамид, доксорубин, месалазин, талидомид, леналидомид, темсиrolimus, эверолимус, флударабин, фостаматиниб, паклитаксел, доксетаксел, офатумумаб, ритуксимаб, дексаметазон, преднизон, CAL-101, ибритумомаб, тозитумомаб, бортезомиб, пентостатин, эндостатин или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает леналидомид.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает бортезомиб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает сорафениб.

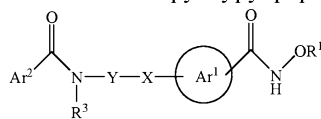
В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает гемцитабин.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает бендамустин.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает R-406.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает ингибитор HDAC. В некоторых вариантах осуществления ингибитор HDAC имеет структуру формулы (I)



Формула (I)

в которой

R¹ представляет собой водород или алкил;

X представляет собой -O-, -NR²- или -S(O)_n, где n равен 0-2 и R² представляет собой водород или алкил;

Y представляет собой необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный фенил, алкилтио, алкилсульфинил, алкилсульфонил, необязательно замещенный фенилалкилтио, необязательно замещенный фенилалкилсульфонил, гидрокси или необязательно замещенный фенокси;

Ar¹ представляет собой фенилен или гетероарилен, при этом указанный Ar¹ является необязательно замещенным одной или двумя группами, независимо выбранными из алкила, галогена, гидрокси, алкокси, галогеналкокси или галогеналкила;

R³ представляет собой водород, алкил, гидроксиалкил или необязательно замещенный фенил; и

Ar² представляет собой арил, аралкил, аралкенил, гетероарил, гетероаралкил, гетероаралкенил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклоалкил или гетероциклоалкилалкил;

и индивидуальные стереоизомеры, индивидуальные геометрические изомеры или их смеси; или его фармацевтически приемлемые соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гистондеацетилазы представляет собой 3-((диметиламино)метил)-N-(2-(4-(гидроксикарбамоил)фенокси)этил)бензофуран-2-карбоксаимид.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает таксол.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает винкристин.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает доксорубин.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает темсилолимус.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает карбоплатин.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает офатумумаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает циклофосфамид, гидроксидаунорубин, винкристин и преднизон и, необязательно, ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает бендамустин и ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает циклофосфамид, винкристин и преднизон, и, необязательно, ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает этопозид, доксорубин, винкристин, циклофосфамид, преднизолон и, необязательно, ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия включает дексаметазон и леналидомид.

Дополнительная терапия рака включает Азотистые иприты, такие как, например, бендамустин, хлорамбуцил, хлорметин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, преднимустин, трофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфат, манносульфат, тресульфат; этиленимины, такие как карбоксон, тиотепа, триазиксон; нитрозомочевины, такие как кармустин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин, семистин, стрептозоцин; эпоксиды, такие как, например, этоглоцид; другие алкилирующие агенты, такие как, например, дакарбазин, митобронитол, пипоброман, темозоломид; аналоги фолиевой кислоты, такие как, например, метотрексат, перметрексед, пралатрексат, ралтитрексед; аналоги пурина, такие как, например, кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин, неларабин, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как, например, азациитидин, капецитабин, кармофур, цитарабин, децитабин, фторурацил, гемцитабин, тегафур; алкалоиды барвинка, такие как, например, винбластин, винкристин, виндезин, винфлуниин, винорелбин; производные подофиллотоксина, такие как, например, этопозид, тенепозид; производные колхицина, такие как, например, демеколцин; таксаны, такие как, например, доцетаксел, паклитаксел, полиглумекс паклитаксела; другие растительные алкалоиды и природные продукты, такие как, например, трабектедин; актиномицины, такие как, например, дактиномицин; антрациклины, такие как, например, акларубин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, идарубин, митоксантрон, пирарубин, валрубин, зорубин; другие цитотоксические антитела, такие как, например, блеомицин, ик-

сабепилон, митомицин, пликамицин; соединения платины, такие как, например, карбоплатин, цисплатин, оксаплатин, сатраплатин; метилгидразины, такие как, например, прокарбазин; сенсibiliзирующие средства, такие как, например, аминоклевулиновая кислота, эфпроксирал, метиламиноклевулилат, порфимер натрия, темпорфин, ингибиторы протеинкиназы, такие как, например, дазатиниб, эрлотиниб, эверолимус, гефитиниб, иматиниб, лапатиниб, нилотиниб, пазонаниб, сорафениб, сунитиниб, темсиролимус; другие противоопухолевые средства, такие как, например, алитретиноин, алтретамин, амзакрин, анагредид, триоксид арсения, аспарагиназа, бексаротен, бортезомиб, целекоксиб, денилейкин дифтитокс, эстрамустин, гидроксикарбамид, иринотекан, лонидамин, мазопрокол, милтефоэин, митогуазон, митотан, облимесен, пегаспаргаза, пентостатин, ромидеписин, ситимаген цераденовек, триазофурин, топотекан, третиноин, вориностат; эстрогены, такие как, например, диэтилстилбенол, этинилэстрадиол, фосфестрол, полиэстрадиол-фосфат; прогестогены, такие как, например, гестонорон, медроксипрогестерон, мегестрол; аналоги гонадотропин-высвобождающего гормона, такие как, например, бусерелин, гозерелин, леупрорелин, трипторелин; антиэстрогены, такие как, например, фулвестрант, тамоксифен, торемифен; антиандрогены, такие как, например, бикалутамид, флутамид, нилутамид; ингибиторы ферментов, аминоклеутетимид, анастрозол, экземестан, форместан, летрозол, ворозол; другие антагонисты гормонов, такие как, например, абареликс, дегареликс; иммуностимуляторы, такие как, например, гистамина дигидрохлорид, мифамуртид, пидотимод, плериксафор, роквинимекс, тимопентин; иммуносупрессанты, такие как, например, эверолимус, гусперимус, лефлуномид, микофеноловая кислота, сиролимус; ингибиторы кальциневрина, такие как, например, циклоспорин, такролимус; другие иммуносупрессанты, такие как, например, азатиоприн, леналидомид, метотрексат, талидомид; и радиофармацевтические препараты, такие как, например, иобенгуан.

Дополнительная терапия рака включает интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухоли, факторы роста или т.п.

Дополнительные терапии рака включают иммуностимуляторы, такие как, например, анцестим, филграстим, ленограстим, молграмостим, пегфилграстим, сарграмостим; интерфероны, такие как, например, природный альфа-интерферон, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерферон альфа-кон-1, интерферон альфа-n1, природный бета-интерферон, интерферон бета-1а, интерферон бета-1b, гамма-интерферон, пегинтерферон альфа-2а, пегинтерферон альфа-2b; интерлейкины, такие как, например, алдеслейкин, опрелвекин; другие иммуностимуляторы, такие как, например, вакцина против туберкулеза BCG, глатирамера ацетат, гистамина дигидрохлорид, иммуноцианин, лентинан, вакцина против меланомы, мифамуртид, пегадемаза, пидотимод, плериксафор, поли I:C (poly I:C), поли ICLC (poly ICLC), роквинимекс, тазонермин, тимопентин; иммуносупрессанты, такие как, например, абатацепт, абетимус, алефацепт, антилимфоцитарный иммуноглобулин (лошадиный), антитимоцитарный иммуноглобулин (кроличий), экулизумаб, эфализумаб, эверолимус, гусперимус, лефлуномид, муромаб-CD3, микофеноловая кислота, натализумаб, сиролимус; ингибиторы фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа), такие как, например, адалимумаб, афелимомаб, цертолизумаб пегол, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб; ингибиторы интерлейкина, такие как, например, анакинра, базиликсимаб, канакинумаб, даклизумаб, меполизумаб, рилонацепт, тоцилизумаб, устекинумаб; ингибиторы кальциневрина, такие как, например, циклоспорин, такролимус; Другие иммуносупрессанты, такие как, например, азатиоприн, леналидомид, метотрексат, талидомид.

Дополнительные терапии рака включают адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, цертолизумаб пегол, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, муромонаб-CD3, натализумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тозитумомаб, трастузумаб или т.п., или их комбинацию.

Дополнительные терапии рака включают моноклональные антитела, такие как, например, алемтузумаб, бевацизумаб, катумаксомаб, цетуксимаб, эдреколомаб, гемтузумаб, офатумумаб, панитумумаб, ритуксимаб, трастузумаб; иммуносупрессанты, экулизумаб, эфализумаб, муромаб-CD3, натализумаб; ингибиторы фактора некроза опухоли альфа (TNF-альфа), такие как, например, адалимумаб, афелимомаб, цертолизумаб пегол, голимумаб, инфликсимаб; ингибиторы интерлейкина, базиликсимаб, канакинумаб, даклизумаб, меполизумаб, тоцилизумаб, устекинумаб; радиофармацевтические препараты, ибритумомаб тиуксетан, тозитумомаб; Другие моноклональные антитела, такие как, например, абаговомаб, адекатумумаб, алемтузумаб, анти-CD30 моноклональное антитело Xmab2513, анти-MET моноклональное антитело MetMab, аполизумаб, апомаб, арцитумомаб, базиликсимаб, биспецефическое антитело 2B1, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, капромаб пендетид, циксутумумаб, клаудиксимаб, конатумумаб, дашетузумаб, деносумаб, экулизумаб, эпратузумаб, эпратузумаб, эртумаксоммаб, этарацизумаб, фигигу-мумаб, фрезолимумаб, галиксимаб, ганитумаб, гемтузумаб озогамин, глембатумумаб, ибритумомаб, инотузумаб озогамин, ипилимумаб, лексатумумаб, линтузумаб, лукатумумаб, мапатумумаб, матузу-мумаб, милатузумаб, моноклональное антитело CC49, нецитумумаб, нимотузумаб, офатумумаб, орегово-мумаб, пертузумаб, рамакурумаб, ранибизумаб, сиплизумаб, сонепцизумаб, танезумаб, тозитумомаб, тра-стузумаб, тремелимумаб, тукотузумаб целмолейкин, велтузумаб, визилизумаб, волоциксимаб, залутуму-мумаб.

Дополнительная терапия рака включает агенты, которые воздействуют на микроокружение опухо-

ли, такое как сеть клеточной сигнализации (например, сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), передающей сигнал от В-клеточного рецептора и IgE-рецептора). В некоторых вариантах осуществления вторым агентом является ингибитор передачи сигнала PI3K или ингибитор сус-киназы. В одном варианте осуществления ингибитор syk представляет собой фостаматиниб (R788). В другом варианте осуществления вторым агентом является ингибитор PKC γ , такой как, в качестве примера только, энзастаурин.

Примеры агентов, которые воздействуют на микроокружение опухоли, включают ингибиторы передачи сигнала PI3K, ингибиторы сус-киназы, ингибиторы протеинкиназы, такие как, например, дазатиниб, эрлотиниб, эверолимус, гефитиниб, иматиниб, лапатиниб, нилотиниб, пазонаниб, сорафениб, сунитиниб, темсиролимус; другие ингибиторы ангиогенеза, такие как, например, GT-111, JJ-101, R1530; другие ингибиторы киназы, такие как, например, AC220, AC480, ACE-041, AMG 900, AP24534, Агг-614, AT7519, AT9283, AV-951, акситиниб, AZD1152, AZD7762, AZD8055, AZD8931, бафетиниб, BAY 73-4506, BGJ398, BGT226, BI 811283, BI6727, BIBF 1120, BIBW 2992, BMS-690154, BMS-777607, BMS-863233, BSK-461364, CAL-101, CEP-11981, CYC116, DCC-2036, динациклиб, довитиниб лактат, E7050, EMD 1214063, ENMD-2076, династрия фостаматиниб, GSK2256098, GSK690693, INCB18424, INNO-406, JNJ-26483327, JX-594, KX2-391, линифаниб, LY2603618, MGCD265, MK-0457, MK1496, MLN8054, MLN8237, MP470, NMS-1116354, NMS-1286937, ON O1919.Na, OSI-027, OSI-930, ингибиторы Btk, PF-00562271, PF-02341066, PF-03814735, PF-04217903, PF-04554878, PF-04691502, PF-3758309, PHA-739358, PLC3397, прогенипоэтин, R547, R763, рамуцирумаб, регорафениб, RO5185426, SAR103168, S3333333CH 727965, SGI-1176, SGX523, SNS-314, TAK-593, TAK-901, TKI258, TLN-232, TTP607, XL147, XL228, XL281RO5126766, XL418, XL765.

Другие примеры противоопухолевых агентов для применения в комбинации с соединением ингибитора Btk включают ингибиторы передачи сигнала митоген-активируемыми протеинкиназами, например, U0126, PD98059, PD184352, PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, вортманнин или LY294002; ингибиторы Syk; ингибиторы mTOR; и антитела (например, ритуксан).

Другие противоопухолевые препараты, которые можно применять в комбинации с соединением ингибитора Btk, включают адриамицин, дактиномицин, блеомицин, винбластин, цисплатин, ацивирин; акларубицин; акозадола гидрохлорид; акронин; адозелезин; альдеслейкин; алтретамин; амбомицин; амелантрона ацетат; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназу; асперлин; азацидин; азетепу; азотомидин; батимастат; бензодепу; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфат; кантиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелезин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормеплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доксорубицин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромаг; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзорибуцина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустина натрия фосфат; этанидазол; этопозид; этопозид фосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабина фосфат; фторурацил; фторцитабин; фосквидон; фостриецин-натрий; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидросимочевину; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; иимозофин; интерлейкин II (включая рекомбинантный интерлейкин II или rIL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ланреотида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрий; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; мазопрокол; майтанзин; мехлорэтамид гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрий; метоприн; метуредепу; митиндомид; митокардин; митокромин; митогиллин; митомалдин; митомидин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофеноловую кислоту; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; пегаспаргазу; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфирин натрий; порфириомидин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пуромидин; пуромидина гидрохлорид; пиразофурин; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрий; спарсомидин; спирогермания гидрохлорид; спиромустин; спироплатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; тализомицин; текогалан натрий; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепу; тиазофурин; тирапазамин; торемифена цитрат; трестолона ацетат; трицирибина фосфат; триметрексамин; триметрексамин глюкуронат; трипторелин; тубулозола гидрохлорид; урацил мустард; уредепу; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндизин; виндизина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлейрозина сульфат; винорельбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорибуцина гидрохлорид.

Другие противоопухолевые препараты, которые можно применять в комбинации с соединением ингибитора Btk, включают 20-эпи-1,25 дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубицин; ацилфульвен; аденипенол; адозелезин; альдеслейкин; антагонисты ALL-TK; алтретамин; амбамустин;

амидокс; амифосфин; аминоклевулиновую кислоту; амрубицин; амсакрин; анагрелид; анастрозол; андографолид; ингибиторы ангиогенеза; антрагонист D; антагонист G; антареликс; антидорсализирующий морфогенетический белок-1; антиандроген, при карциноме предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколина глицинат; гены-модуляторы апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновую кислоту; ага-CDP-DL-PTBA; аргининдеаминазу; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроподин; производные бета-лактама; бета-алетин; бетакламицин В; бетулиновую кислоту; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрен; бисазиридинилспермин; биснафид; бистратен А; бизелезин; брефлат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксмин; кальцитриол; кальфостин С; производные камптотецина; канарипокс IL-2; капекитабин; карбоксамидоаминотриазол; карбоксиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; ингибитор, выделенный из хряща; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин В; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалина сульфнамид; цикапрост; цис-порфирина; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин А; коллисмидин В; комбретастатин А4; аналоги комбретастина; конагенин; кармбесцидин 816; кристанол; криптофицин 8; производные криптофицина А; курацин А; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципермицин; цитарабина оксфосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин В; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диазиквон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацидин; 9-диоксамицин; дифенилспиромустин; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дрозлоксифен; дронабинол; дуокармуцин SA; эбселен; экомустин; эдельфосин; эдрекломаб; эфлорнитин; элемин; эмитефур; эпирубицин; эпистерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозида фосфат; эксместан; фазарозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; фластерон; флударабин; флудодаунорубина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фострицин; фотемустин; гадолиния тексафин; галлия нитрат; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; герегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперин; ибандроновую кислоту; идарубицин; иодоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имихимод; иммуностимулирующие пептиды; инсулин, такой как, например, ингибитор рецептора инсулиноподобного фактора роста 1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; иододоксорибуин; ипомеанол, 4-; ироплакт; ирсогладин; изобенгазол; изогомогаликондрин В; итасетрон; джасплакинолид; кагалалид F; ламераллина-N триацетат; ланреотид; лейнамицин; ленограстим; лентинана сульфат; лептолстатин; летрозол; лейкоз-ингибирующий фактор; лейкоцитарный альфа-интерферон; лейпролид+эстроген+прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; аналог линейного полиамина; липофильный дисахарид-пептид; липофильные соединения платины; лиссоклинамид 7; лобоплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ловастатин; локсорибин; луртотекан; лютеция тексафин; лизофиллин; литические пептиды; майтанзин; манностаин А; маримастат; мазопрокол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матриксной металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназу; метоклопрамид; ингибиторы MIF; мифепристон; милтефозин; миромустин; мисматч двухцепочечную РНК; митогазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксин фактор роста фибробластов-сапорин; митоксантрон; мафаротен; малграмостим; моноклональное антитело, человеческий хорионический гонадотропин; монофосфорильный липид A+sk клеточной стенки микробактерии; мопидамол; ингибитор гена множественной лекарственной резистентности; терапия на основе множественного опухолевого супрессора 1; противораковый агент-мустанд; микапероксид В; экстракт клеточных стенок микробактерий; мириапорон; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновую кислоту; нейтральную эндопептидазу; нилутамид; низамицин; модуляторы оксида азота; антиоксиданты нитроксида; нитруллин; Об-бензилгуанин; октереотид; оксиденон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; орацин; пероральный индуктор цитокинов; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; палауамин; пальмитоултризоксин; памидроновую кислоту; панакситриол; паномифен; парабактин; пазеллипин; пегаспаргазу; пелдизин; пентозан полисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатаз; пикибинил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплексы платины; соединения платины; комплекс платины с триамином; порфимер натрий; порфирамицин; преднизон; пропилен бис-акридон; простагландин J2; ингибиторы протеасом; иммунный модулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроалгал; ингибиторы протеинтирозинфосфатаз; ингибиторы пуриннуклеозид-фосфорилаз; пиразолакридин; конъюгат полиоксиэтилена с пиридоксильрованным гемоглобином; антагонисты raf; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы ras фарнезилпротеинтрансферазы; ингибиторы ras; ингибитор ras-GAP; деметилированный ретеллипин; этидронат рения Re 186; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид; роглетимид; рохитукин; ромуртид; роквинимекс; рубигинон B1; рубоксил; сафингол; саинтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; ингибитор старения 1; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы сигнальной трансдукции; модуляторы сигнальной трансдукции; одноцепочечный антиген-связывающий белок; сизофиран; собузоксан; борокаплат

натрия; фенилацетат натрия; солверол; соматомедин-связывающий белок; сонермин; спарфосовую кислоту; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфонизин; гиперактивный антагонист вазоактивного интестинального пептида; сурадишту; сурамин; свайнсониин; синтетические гликозаминогликаны; таллимустин; тамоксифен метиодид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирилий; ингибиторы теломераз; темопорфин; темозоломид; теннопозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбopoэтин; миметик тромбopoэтина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; тиреоидный стимулирующий гормон; олово этиопурпурин; тирапазамин; титаноцен бихлорид; топсентин; торемифен; фактор тотипотентности стволовых клеток; ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилуридин; трицирибин; триметрексат; трипторелин; трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназ; тирофостины; ингибиторы UBC; убенимекс; ингибирующий фактор роста урогенитального синуса; антагонисты урокиназного рецептора; вапреотид; вариолин В; векторную систему; эритроцитная генная терапия; веларезол; верамин; вердины; вертепорфин; винорельбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и зино-статин стимуламер.

Еще другие противоопухолевые препараты, которые можно применять в комбинации с соединением ингибитора Btk, включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, природные продукты или гормоны, например азотистые иприты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил и т.д.), алкилсульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин и т.д.) или триазены (декарбазин, и т.д.). Примеры антиметаболитов включают, но без ограничения, аналог фолиевой кислоты (например, метотрексат) или аналоги пиримидина (например, цитарабин), аналоги пурина (например, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин).

Примеры алкилирующих агентов, которые можно применять в комбинации с соединением ингибитора Btk, включают, но без ограничения, азотистые иприты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан и т.д.), этиленмин метилмеламины (например, гексаметилмеламин, тиотепа), алкилсульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин и т.д.) или триазены (декарбазин и т.д.). Примеры антиметаболитов включают, но без ограничения, аналог фолиевой кислоты (например, метотрексат) или аналоги пиримидина (например, фторурацил, флоксоуридин, цитарабин), аналоги пурина (например, меркаптопурин, тиогуанин, пентастатин).

Примеры противоопухолевых препаратов, которые действуют путем ареста клеток в G2-M фазах благодаря стабилизированным микротрубочкам и могут применяться в комбинации с соединением ингибитора Btk, включают, но без ограничения, следующие имеющиеся в продаже лекарственные средства и лекарственные средства, находящиеся в стадии разработки: эрбулозол (также известный как R-55104), доластатин 10 (также известный как DLS-10 и NSC-376128), мивобулина изетионат (также известный как CI-980), винкристин, NSC-639829, дискодермолит (также известный как NVP-XX-A-296), ABT-751 (Abbott, также известный как E-7010), алторгиртины (такие как алторгиртин А и алторгиртин С), спонгистатины (такие как спонгистатин 1, спонгистатин 2, спонгистатин 3, спонгистатин 4, спонгистатин 5, спонгистатин 6, спонгистатин 7, спонгистатин 8 и спонгистатин 9), цемадотина гидрохлорид (также известный как LU-103793 и NSC-D-669356), эпотилоны (такие как эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С (также известные как дезоксиэпотилон А или dEpoA), эпотилон D (также называемый KOS-862, dEpoB) и дезоксиэпотилон В), эпотилон Е, эпотилон F, эпотилон В N-оксид, эпотилон А N-оксид, 16-аза-эпотилон В, 21-аминоэпотилон В (также известный как BMS-310705), 21-гидроксиэпотилон D (также известный как дезоксиэпотилон F и dEpoF), 26-фторэпотилон), ауристатин PE (также известный как NSC-654663), соблидотин (также известный как TZT-1027), LS-4559-P (Pharmacia, также известный как LS-4577), LS-4578 (Pharmacia, также известный как LS-477-P), LS-4477 (Pharmacia), LS-4559 (Pharmacia), RPR-112378 (Aventis), винкристина сульфат, DZ-3358 (Daiichi), FR-182877 (Fujisawa, также известный как WS-9885B), GS-164 (Takeda), GS-198 (Takeda), KAR-2 (Hungarian Academy of Sciences), BSF-223651 (BASF, также известный как ILX-651 и LU-223651), SAH-49960 (Lilly/Novartis), SDZ-268970 (Lilly/Novartis), AM-97 (Armada/Kyowa Hakko), AM-132 (Armada), AM-138 (Armada/Kyowa Hakko), IDN-5005 (Indena), криптофицин 52 (также известный как LY-355703), AC-7739 (Ajinomoto, также известный как AVE-8063A и CS-39.HCl), AC-7700 (Ajinomoto, также известный как AVE-8062, AVE-8062A, CS-39-L-Ser.HCl, и RPR-258062A), вилтевуамид, тубулизин А, канаденсол, centaуреидин (также известный как NSC-106969), T-138067 (Tularik, также известный как T-67, TL-138067 и TI-138067), COBRA-1 (Parker Hughes Institute, также известный как DDE-261 и WFQ-261), H10 (Kansas State University), H16 (Kansas State University), онкоцидин А1 (также известный как BTO-956 и DIME), DDE-313 (Parker Hughes Institute), фуджианолид В, лаулималид, SPA-2 (Parker Hughes Institute), SPA-1 (Parker Hughes Institute, также известный как SPIKET-P), 3-IAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, также известный как MF-569), наркозин (также известный как NSC-5366), наскапин, D-24851 (Asta Medica), A-105972 (Abbott), гемиастерлин, 3-BAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, также известный как MF-191), TMPN (Arizona State University), ванадоцен ацетилацетонат, T-138026 (Tularik), монсатрол, инанонин (также известный как NSC-698666), 3-IAABE (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine), A-204197 (Abbott), T-607 (Tularik, также известный как T-900607), RPR-115781 (Aventis), элеутеробины (такие как десметилэлеутеробин,

дезаэтиллеутеробин, изоэлеутеробин A и Z-элеутеробин), карибазозид, карибазолин, галихондрин B, D-64131 (Asta Medica), D-68144 (Asta Medica), диазонамид A, A-293620 (Abbott), NPI-2350 (Nereus), таккалонолид A, TUB-245 (Aventis), A-259754 (Abbott), диозостатин, (-)-фенилагистин (также известный как NSCL-96F037), D-68838 (Asta Medica), D-68836 (Asta Medica), миосеверин B, D-43411 (Zentaris, также известный как D-81862), A-289099 (Abbott), A-318315 (Abbott), HTI-286 (также известный как SPA-110, трифторацетатная соль) (Wyeth), D-82317 (Zentaris), D-82318 (Zentaris), SC-12983 (NCI), резверастатин фосфат натрия, BPR-OY-007 (National Health Research Institutes) и SSR-250411 (Sanofi).

Биомаркеры

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыт способ лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающий: (а) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; и (b) получение профиля биомаркеров для популяции клеток, изолированных из множества клеток. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии биомаркеров используется для диагностики, установления прогноза или создания прогностического профиля гематологической злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает на экспрессию биомаркера, уровень экспрессии биомаркера, мутации в биомаркере или присутствие биомаркера.

В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, вовлечена ли Btk-опосредованная передача сигнала в развитие злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, вовлечена ли Btk-опосредованная передача сигнала в выживаемость гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, что Btk-опосредованная передача сигнала не вовлечена в развитие гематологической злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, что Btk-опосредованная передача сигнала не вовлечена в выживаемость гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, вовлечена ли BCR-опосредованная передача сигнала в развитие гематологической злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, вовлечена ли BCR-опосредованная передача сигнала в выживаемость гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, что BCR-опосредованная передача сигнала не вовлечена в развитие гематологической злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профиль биомаркеров указывает, что BCR-опосредованная передача сигнала не вовлечена в выживаемость гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, ABC-подтипа (ABC-DLBCL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). В некоторых вариантах осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому (FL).

В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой любой цитогенетический маркер, молекулярный маркер клеточной поверхности или белок, или маркер РНК экспрессии. В некоторых вариантах осуществления биомаркер представляет собой: ZAP70; t(14,18); β -2-микроглобулин; мутационный статус p53; мутационный статус ATM; del(17)p; del(11)q; del(6)q; CD5; CD11c; CD19; CD20; CD22; CD25; CD38; CD103; CD138; экспрессию секретируемого поверхностного или цитоплазматического иммуноглобулина; мутационный статус V_H; или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает проведение у субъекта второй терапии на основе профиля биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает отсутствие введения необратимого ингибитора Btk на основе профиля биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает отсутствие проведения второй терапии на основе профиля биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает прогнозирование эффективности терапии на основе профиля биомаркеров.

В определенных вариантах осуществления способы включают диагностику, установление прогноза или создание прогностического профиля гематологической злокачественной опухоли на основе экспрессии или присутствия определенных биомаркеров. В других вариантах осуществления способы, кроме того, включают разделение популяций пациентов на основе экспрессии или присутствия определенных биомаркеров в пораженных лимфоцитах. В еще других вариантах осуществления способы, кроме того, включают определение терапевтического средства для субъекта на основе экспрессии или присутствия определенных биомаркеров в пораженных лимфоцитах. В еще других вариантах осуществления спосо-

В других аспектах в настоящем документе обеспечены способы разделения популяций пациентов, имеющих гематологическую злокачественную опухоль, включающие: (а) введение ингибитора Btk субъекту в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов; и (б) определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов; при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для разделения пациентов для лечения гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с использованием флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS).

В еще других аспектах в настоящем документе обеспечены способы определения терапевтического средства у субъекта, имеющего гематологическую злокачественную опухоль, включающие: (а) введение ингибитора Btk субъекту в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов; и (б) определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов; при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для определения терапевтического средства для лечения гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с использованием флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS).

В еще других аспектах в настоящем документе обеспечены способы прогнозирования ответа на терапию у субъекта, имеющего гематологическую злокачественную опухоль, включающие: (а) введение ингибитора Btk субъекту в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов; и (б) определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов; при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для прогнозирования ответа субъекта на терапию гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов определяется с использованием флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS).

В определенных аспектах в настоящем документе обеспечены способы диагностики, установления прогноза или создания прогностического профиля гематологической злокачественной опухоли у субъекта, включающие определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов у субъектов, которые получили дозу ингибитора Btk, при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для диагностики гематологической злокачественной опухоли, установления прогноза гематологической злокачественной опухоли или создания прогностического профиля гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления доза ингибитора Btk является достаточной для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов, определенное с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов, кроме того, включает выделение, обнаружение или измерение одного или более типов лимфоцитов. В еще другом варианте осуществления ингибитор Btk представляет собой обратимый или необратимый ингибитор.

В других аспектах в настоящем документе обеспечены способы разделения популяции пациентов, имеющих гематологическую злокачественную опухоль, включающие определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов у субъекта, который получил дозу ингибитора Btk, при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для разделения пациентов для лечения гематологической злокачественной опухоли. В од-

ном варианте осуществления доза ингибитора Btk является достаточной для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов, определенное с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов, кроме того, включает выделение, обнаружение или измерение одного или более типов лимфоцитов. В еще другом варианте осуществления ингибитор Btk представляет собой обратимый или необратимый ингибитор.

В еще других аспектах в настоящем документе обеспечены способы определения терапевтического средства для субъектов, имеющих гематологическую злокачественную опухоль, включающие определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов у субъекта, который получил дозу ингибитора Btk, при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для определения терапевтического средства для лечения гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления доза ингибитора Btk является достаточной для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов, определенное с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов, кроме того, включает выделение, обнаружение или измерение одного или более типов лимфоцитов. В еще другом варианте осуществления ингибитор Btk представляет собой обратимый или необратимый ингибитор.

В еще других аспектах в настоящем документе обеспечены способы прогнозирования ответа на терапию у субъектов, имеющих гематологическую злокачественную опухоль, включающие определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов у субъекта, который получил дозу ингибитора Btk, при этом экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров используется для прогнозирования ответа субъекта на терапию гематологической злокачественной опухоли. В одном варианте осуществления доза ингибитора Btk является достаточной для того, чтобы вызвать увеличение или появление в крови субпопуляции лимфоцитов, определенное с помощью иммунофенотипирования. В другом варианте осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов, кроме того, включает выделение, обнаружение или измерение одного или более типов лимфоцитов. В еще другом варианте осуществления ингибитор Btk представляет собой обратимый или необратимый ингибитор.

В настоящем документе предполагается, что в некоторых вариантах осуществления могут быть использованы любые биомаркеры, связанные с гематологическими злокачественными опухолями. Эти биомаркеры включают любую биологическую молекулу (обнаруженную в крови, других жидкостях организма или тканях) или любую хромосомную аберрацию, которая является признаком гематологической злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления биомаркеры включают, но без ограничения, TdT, CD5, CD11c, CD19, CD20, CD22, CD79a, CD15, CD30, CD38, CD138, CD103, CD25, ZAP-70, мутационный статус p53, мутационный статус ATM, мутационный статус IgV_H, делеции хромосомы 17 (del 17p), делеции хромосомы 6 (del 6q), делеции хромосомы 7 (del 7q), делеции хромосомы 11 (del 11q), трисомию 12 хромосомы, делеции хромосомы 13 (del 13 q), хромосомную транслокацию t(11:14), хромосомную транслокацию t(14:18), CD10, CD23, бета-2-микроглобулин, экспрессию bcl-2, CD9, присутствие *Helicobacter pylori*, CD154/CD40, Akt, NF-κB, WNT, Mtor, ERK, MAPK, и экспрессию Src тирозинкиназы. В определенных вариантах осуществления биомаркеры включают ZAP-70, CD5, t(14;18), CD38, β-2-микроглобулин, мутационный статус p53, мутационный статус ATM, делецию хромосомы 17p, делецию хромосомы 11q, поверхностный или цитоплазматический иммуноглобулин, CD138, CD25, делецию 6q, CD19, CD20, CD22, CD11c, CD 103, делецию хромосомы 7q, мутационный статус V_H и их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления субпопуляции пациентов, имеющие гематологическую злокачественную опухоль или предраковое состояние, которые будут иметь положительный результат после общеизвестного лечения, идентифицированы путем скрининга кандидатных субъектов на один или несколько клинически значимых биомаркеров, известных в данной области. Любой клинически значимый прогностический маркер, известный специалистам в данной области, может быть использован. В некоторых вариантах осуществления субпопуляция включает пациентов, имеющих хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), и клинически значимые прогностические маркеры, представляющие особый интерес, включают, но без ограничения, ZAP-70, CD38, бета-2-микроглобулин и цитогенетические маркеры, например, мутационный статус p53, мутационный статус ATM, делеции хромосом, такие как делеция хромосомы 17p и делеция хромосомы 11q, все из которых являются клинически значимыми прогностическими маркерами для этого заболевания.

ZAP-70 представляет собой тирозинкиназу, которая связана с зета субъединицей Т-клеточного антигенного рецептора (TCR) и играет ключевую роль в активации и развитии Т-клеток (Chan et al. (1992) Cell 71:649-662). ZAP-70 подвергается фосфорилированию по тирозину и является важной в опосредовании сигнальной трансдукции после стимуляции TCR. Было продемонстрировано, что сверхэкспрессия или конститутивная активация тирозинкиназ вовлечена в развитие ряда злокачественных опухолей,

включая лейкоз и некоторые типы солидных опухолей. Например, повышенные уровни экспрессии РНК ZAP-70 являются прогностическим маркером хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (Rosenwald et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:1639-1647). ZAP-70 экспрессируется в Т-клетках и естественных клетках-киллерах, но неизвестно об экспрессии ZAP-70 в нормальных В-клетках. Однако ZAP-70 экспрессируется при высоких уровнях в В-клетках у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (CLL/SLL) и, в частности, в подгруппе пациентов с CLL, которые имеют тенденцию к более агрессивному клиническому течению, которое обнаруживается у пациентов с CLL/SLL с немутированными генами Ig (Wiestner et al. (2003) *Blood* 101: 4944-4951; заявка на патент США № 20030203416). Благодаря корреляции между уровнями экспрессии ZAP-70 и мутационным статусом гена Ig, ZAP-70 можно применять в качестве прогностического индикатора для идентификации тех пациентов, которые вероятно имеют болезнь тяжелой степени (высокий уровень ZAP-70, немутированные гены Ig), и которые, следовательно, являются кандидатами на агрессивную терапию.

CD38 представляет собой молекулу сигнальной трансдукции, а также экзофермент, катализирующий синтез и распад циклической АДФ-рибозы (сADPR). Экспрессия CD38 присутствует на высоких уровнях в В-клетках-предшественниках костного мозга, подавлена в дремлющих нормальных В-клетках и затем реэкспрессирована в герминально дифференцированных клетках плазмы (Campana et al. (2000) *Chem. Immunol.* 75:169-188). CD38 является надежным прогностическим индикатором в В-CLL, с экспрессией CD38, в целом указывающей на менее благоприятный исход (D'Arena et al. (2001) *Leuk. Lymphoma* 42:109; Del Poeta et al. (2001) *Blood* 98:2633; Durig et al. (2002) *Leukemia* 16:30; Ibrahim et al. (2001) *Blood* 98:181; Deaglio et al. (2003) *Blood* 102:2146-2155). Неблагоприятные клинические признаки связи с экспрессией CD38 включают позднюю стадию заболевания, слабый ответ на химиотерапию, необходимость более коротких сроков начала лечения и более короткое время выживания (Deaglio et al. (2003) *Blood* 102:2146-2155). Вначале наблюдалась сильная корреляция между экспрессией CD38 и мутацией гена IgV, при этом пациенты, имеющие немутированные гены V, показывали более высокое процентное содержание клеток CD38^{sup}+ В-CLL, чем пациенты с мутированными генами V (Damle et al. (1999) *Blood* 94:1840-1847). Однако последующие исследования показали, что экспрессия CD38 не всегда коррелирует с перестройкой генов IgV (Hamblin et al. (2002) *Blood* 99:1023; Thunberg et al. (2001) *Blood* 97: 1892).

p53 представляет собой ядерный фосфопротеин, который действует в качестве супрессора опухоли. p53 дикого типа вовлечен в регуляцию клеточного роста и деления. p53 связывается с ДНК, стимулируя выработку белка (p21), который взаимодействует со стимулирующим клеточное деление белком (cdk2). Когда p21 связан с cdk2, клетка блокирована от вступления на следующую стадию клеточного деления. Мутантный p53 не способен к эффективному связыванию с ДНК, предотвращая, таким образом, p21 от действия в качестве сигнала остановки для клеточного деления, что приводит к неконтролируемому клеточному делению и формированию опухоли. Кроме того, p53 регулирует индукцию программируемой клеточной гибели (апоптоз) в ответ на повреждение ДНК, клеточный стресс или аберрантную экспрессию некоторых онкогенов. Было доказано, что экспрессия p53 дикого типа в некоторых раковых клеточных линиях восстанавливает контроль супрессии роста (Casey et al. (1991) *Oncogene* 6:1791-1797; Takahashi et al. (1992) *Cancer Res.* 52:734-736). Мутации в p53 обнаружены в большинстве типов опухолей, включая опухоли толстой кишки, молочной железы, легких, яичника, мочевого пузыря и многих других органов. Было обнаружено, что мутации p53 ассоциированы с лимфомой Беркитта, В-клеточным острым лимфобластным лейкозом L3-типа, хроническим В-клеточным лимфоцитарным лейкозом (Gaidano et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5413-5417). Было также обнаружено, что аномалии p53 ассоциируются с В-клеточным пролимфоцитарным лейкозом (Lens et al. (1997) *Blood* 89:2015-2023). Ген p53 расположен на коротком плече хромосомы 17 в 17p13.105-p12.

В-2-микροглобулин представляет собой внеклеточный белок, который нековалентно связан с альфа-цепью главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС). В-2-микροглобулин детектируется в сыворотке, и является неблагоприятным прогностическим индикатором в CLL (Keating et al. (1998) *Blood* 86:606a) и лимфоме Ходжкина (Chronowski et al. (2002) *Cancer* 95:2534-2538). В-2-микροглобулин применяется в клинической практике в отношении лимфопролиферативных заболеваний, включая лейкоз, лимфому и множественную миелому, при этом уровни в сыворотке β-2-микροглобулина связаны с нагрузкой опухолевыми клетками, прогнозом и активностью заболевания (Bataille et al. (1983) *Br. J. Haematol.* 55:439-447; Aviles et al. (1992) *Rev. Invest. Clin.* 44:215-220). В-2-микροглобулин также является эффективным в стадировании пациентов с миеломой (Pasqualetti et al. (1991) *Eur. J. Cancer* 27:1123-1126).

Цитогенетические аберрации могут также применяться в качестве маркеров для создания прогностического профиля гематологической злокачественной опухоли. Например, хромосомные аномалии обнаружены у большого процента пациентов с CLL и помогают при прогнозировании течения CLL. Например, делеция 17p является показателем агрессивного развития заболевания. Кроме того, известно, что пациенты с CLL с хромосомной делецией 17p или мутацией в p53, или и те и другие слабо отвечают на химиотерапевтические средства и ритуксимаб. Аллельная потеря на хромосоме 17p также может являться эффективным прогностическим маркером в колоректальном раке, при этом пациенты с делецией 17p ассоциируются с повышенной тенденцией распространения заболевания в колоректальном раке (Khine et

al. (1994) *Cancer* 73:28-35).

Делеции длинного плеча хромосомы 11 (11q) являются одной из наиболее частых структурных перестроек хромосом в различных типах лимфопролиферативных нарушений. Пациенты с CLL с делецией хромосомы 11q и возможными ATM мутациями имеют слабую выживаемость по сравнению с пациентами без этого дефекта или делеции 17p. Кроме того, делеция 11q часто сопровождается обширным вовлечением лимфатических узлов (Dohner et al. (1997) *Blood* 89:2516-2522). Эта делеция также идентифицирует пациентов, которые имеют высокий риск персистирующего течения заболевания после терапии высокими дозами и аутотрансплантации.

Мутированный ген атаксии телеангиэктазии (ATA4) представляет собой опухоль-супрессорный ген, который вовлечен в арест клеточного цикла, апоптоз и восстановление двухнитевых разрывов ДНК. Он обнаружен на хромосоме 11. Мутации ATM ассоциированы с повышенным риском рака молочной железы у женщин с семейной историей рака молочной железы (Chenevix-Trench et al. (2002) *J. Natl. Cancer Inst.* 94:205-215; Thorstenson et al. (2003) *Cancer Res.* 63:3325-3333) и/или рака молочной железы с ранним началом (Izatt et al. (1999) *Genes Chromosomes Cancer* 26:286-294; Teraoka et al. (2001) *Cancer* 92:479-487). Существует также высокая частота связи рабдомиосаркомы с мутацией/делецией гена ATM (Zhang et al. (2003) *Cancer Biol. Ther.* 1:87-91).

Способы детекции хромосомных аномалий у пациента хорошо известны в данной области (смотри, например, Cuneo et al. (1999) *Blood* 93:1372-1380; Dohner et al. (1997) *Blood* 89:2516-2522). Способы измерения мутированных белков, таких как ATM, хорошо известны в данной области (смотри, например, Butch et al. (2004) *Clin. Chem.* 50: 2302-2308).

Таким образом, биомаркеры, которые оценивают в способах, описанных здесь, включают белки клеточной выживаемости и апоптотические белки, описанные выше, а также белки, вовлеченные в сигнальные пути, связанные с гематологической злокачественной опухолью. Определение экспрессии или присутствия может быть на уровне белка или нуклеиновой кислоты. Таким образом, биомаркеры включают эти белки и гены, кодирующие эти белки. Когда детекция проводится на уровне белка, биомаркерный белок содержит полипептид полной длины или его любой детектируемый фрагмент, и может включать варианты этих белковых последовательностей. Аналогичным образом, когда обнаружение осуществляется на нуклеотидном уровне, биомаркерная нуклеиновая кислота включает ДНК, содержащую кодирующую последовательность полной длины, фрагмент кодирующей последовательности полной длины, варианты этих последовательностей, например естественным образом возникающие варианты или сплайс-варианты, или комплемент такой последовательности. Биомаркерные нуклеиновые кислоты также включают РНК, например мРНК, содержащую последовательность полной длины, кодирующую представляющий интерес биомаркерный белок, фрагмент представляющей интерес последовательности РНК полной длины или варианты этих последовательностей. Биомаркерные белки и биомаркерные нуклеиновые кислоты также включают варианты этих последовательностей. Под "фрагментом" предполагается часть полинуклеотида или часть аминокислотной последовательности и, таким образом, белок кодируется. Полинуклеотиды, которые являются фрагментами биомаркерной нуклеотидной последовательности, обычно содержат по меньшей мере 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300 или 1400 соседних нуклеотидов или вплоть до числа нуклеотидов, присутствующих в биомаркерном полинуклеотиде полной длины, раскрытом здесь. Фрагмент биомаркерного полинуклеотида будет, как правило, кодировать по меньшей мере 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200 или 250 соседних аминокислот, или вплоть до общего числа аминокислот, присутствующих в биомаркерном белке полной длины по данному изобретению. "Вариант" означает, по существу, сходные последовательности. Как правило, варианты конкретного биомаркера изобретения будут иметь по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с биомаркером, как определено с помощью программ выравнивания последовательностей, известных в данной области.

Как указано выше, любой способ, известный в данной области, может быть использован в способах для определения экспрессии или присутствия биомаркера, описанного здесь. Уровни биомаркеров, циркулирующих в образцах крови, полученных от кандидного субъекта, могут быть измерены, например, с помощью ELISA, радиоиммуноанализа (RIA), электрохемилюминесценции (ECL), Вестерн-блоттинга, мультиплексных технологий или других аналогичных способов. Экспрессия биомаркеров на клеточной поверхности может быть измерена, например, с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии, Вестерн-блоттинга, иммунной преципитации, выбора магнитного микроносителя и количественного определения клеток, экспрессирующих любые из этих маркеров клеточной поверхности. Уровни экспрессии РНК биомаркеров могут быть измерены с помощью RT-PCR, Q_t-PCR, микрочипов, Нозерн-блоттинга или других аналогичных методов.

Как отмечено ранее, определение экспрессии или присутствия представляющего интерес биомаркера на белковом или нуклеотидном уровне может быть выполнено с использованием любого метода детекции, известного специалистам в данной области. Под "детекцией экспрессии" или "детекцией уровня" понимается определение уровня экспрессии или присутствия биомаркерного белка или гена в биологическом образце. Таким образом, "детекция экспрессии" охватывает ситуации, когда определено, что

биомаркер не экспрессируется, не экспрессируется детектируемым образом, экспрессируется на низком уровне, экспрессируется на нормальном уровне или сверхэкспрессируется.

В определенных аспектах обеспеченного в настоящем документе способа одну или более субпопуляций лимфоцитов изолируют, детектируют или измеряют. В определенных вариантах осуществления одну или более субпопуляций лимфоцитов изолируют, детектируют или измеряют с использованием методов иммунофенотипирования. В других вариантах осуществления одну или более субпопуляций лимфоцитов изолируют, детектируют или измеряют с использованием методов сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

В определенных вариантах осуществления способов, обеспеченных здесь, один или более биомаркеров включают ZAP-70, CD5, t(14;18), CD38, β -2-микроглобулин, мутационный статус p53, мутационный статус ATM, делецию хромосомы 17p, делецию хромосомы 11q, поверхностный или цитоплазматический иммуноглобулин, CD138, CD25, делецию 6q, CD19, CD20, CD22, CD11c, CD 103, делецию хромосомы 7q, мутационный статус V_H или их комбинацию.

В определенных аспектах описанных здесь способов стадия определения предусматривает определение экспрессии или присутствия комбинации биомаркеров. В определенных вариантах осуществления комбинация биомаркеров представляет собой CD19 и CD5, или CD20 и CD5.

В определенных аспектах экспрессия или присутствие этих различных биомаркеров и любых клинически значимых прогностических маркеров в биологическом образце может быть детектировано на уровне белка или нуклеиновой кислоты с использованием, например, иммуногистохимических методов или методов на основе нуклеиновой кислоты, таких как гибридизация *in situ* и RT-PCR. В одних вариантах осуществления детекцию экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров проводят с помощью метода амплификации нуклеиновой кислоты, метода секвенирования нуклеиновой кислоты, методом, в котором используется микрочип с нуклеиновой кислотой (ДНК и РНК), или методом гибридизации *in situ* с использованием меченых специфических зондов.

В других вариантах осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров проводят посредством гель-электрофореза. В одном варианте осуществления определение проводят посредством переноса в мембрану и гибридизации со специфическим зондом.

В других вариантах осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров проводят методом диагностической визуализации.

В еще других вариантах осуществления определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров проводят с помощью детектируемого твердого субстрата. В одном варианте осуществления детектируемый твердый субстрат представляет собой парамагнитные наночастицы, функционализированные антителами.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечены способы детекции или измерения резидуальной лимфомы после курса терапии для принятия решения о необходимости продолжения или прекращения лечения, или изменения одного терапевтического средства на другое, включающие определение экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров из одной или более субпопуляций лимфоцитов у субъекта, при этом курс терапии представляет собой терапию ингибитором Btk.

Способы детекции экспрессии биомаркеров, описанных здесь, и необязательно цитокиновых маркеров в тестируемых и контрольных биологических образцах включают любые способы, которые определяют количество или присутствие этих маркеров на уровне нуклеиновой кислоты или на уровне белка. Такие способы хорошо известны в данной области и включают, но без ограничения, Вестерн-блоттинг, Нозерн-блоты, ELISA, иммунопреципитацию, иммунофлуоресценцию, проточную цитометрию, иммуногистохимию, методики гибридизации нуклеиновой кислоты, способы обратной транскрипции нуклеиновой кислоты и способы амплификации нуклеиновой кислоты. В конкретных вариантах осуществления экспрессию биомаркера детектируют на уровне белка с использованием, например, антител, которые направлены против специфических биомаркерных белков. Эти антитела могут быть использованы в различных методах, таких как Вестерн-блот-анализ, ELISA, мультиплексные технологии, иммунопреципитация или методы иммуногистохимического исследования. В некоторых вариантах осуществления детекцию цитокиновых маркеров выполняют с помощью электрохемилюминесценции (ECL).

Любые средства предполагаются для специфической идентификации и количественной оценки биомаркера (например, биомаркера, биомаркера клеточной выживаемости или пролиферации, биомаркера апоптоза, биомаркера Btk-опосредованного сигнального пути) в биологическом образце кандидатного субъекта. Так, в некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии в биологическом образце представляющего интерес биомаркерного белка детектируют с помощью связывающего белка, способного к специфическому взаимодействию с этим биомаркерным белком или его биологически активным вариантом. Предпочтительно, могут быть использованы меченые антитела, их связывающие части или другие партнеры связывания. Слово "метка" при использовании здесь относится к детектируемому соединению или композиции, которая конъюгирована непосредственно или опосредованно с антителом таким образом, чтобы генерировать «меченое» антитело. Метка может быть детектируемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение соединения субстрата или композиции, которая является детектируемой.

Антитела для детекции биомаркерного белка могут быть моноклонального или поликлонального происхождения, или могут быть получены синтетическими или рекомбинантными методами. Количество комплексного белка, например количество биомаркерного белка, ассоциированного со связывающим белком, например антителом, которое специфически связывается с биомаркерным белком, определяют с использованием стандартных методов детекции белка, известных специалистам в данной области. Подробный обзор дизайна иммунологического анализа, теории и протоколов можно найти в многочисленных материалах в данной области (смотри, например, Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY)); Coligan et al., eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.).

Выбор маркера, используемого для мечения антител, будет изменяться в зависимости от применения. Однако выбор маркера может быть легко осуществлен специалистом в данной области. Эти меченые антитела можно использовать в иммуноанализах, а также в гистологических исследованиях для детекции присутствия любого представляющего интерес биомаркера или белка. Меченые антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Кроме того, антитела, предназначенные для детекции представляющего интерес белка, могут быть мечены радиоактивным атомом, ферментом, хромофорным или флуоресцентным фрагментом, или колориметрической меткой, как описано где-либо еще в настоящем документе. Выбор метки также будет зависеть от желательных пределов детекции. Ферментные анализы (ELISA) обычно обеспечивают детекцию окрашенного продукта, образованного путем взаимодействия меченого ферментом комплекса с субстратом фермента. Радионуклиды, которые могут служить в качестве детектируемых меток, включают, например, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 и Pd-109. Примеры ферментов, которые могут служить в качестве детектируемых меток, включают, но без ограничения, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназу. Хромофорные фрагменты включают, но без ограничения, флуоресцеин и родамин. Антитела могут быть конъюгированы с этими метками способами, известными в данной области. Например, ферменты и хромофорные молекулы могут быть конъюгированы с антителами при помощи связывающих агентов, таких как диальдегиды, карбодиимиды, дималеимиды и т.п. Альтернативно, конъюгирование может происходить посредством пары лиганд-рецептор. Примерами пригодных пар лиганд-рецептор являются биотин-авидин или биотин-стрептавидин и антитело-антиген.

В определенных вариантах осуществления экспрессию или присутствие одного или более биомаркеров, или других представляющих интерес белков в биологическом образце, например образце физиологической жидкости, определяют с помощью радиоиммуноанализов или иммуноанализов со связанным ферментом (ELISA), конкурентно-связывающих иммуноанализов со связанным ферментом, дот-блот анализа (смотри, например, *Promega Protocols and Applications Guide* (2nd ed.; Promega Corporation (1991))), вестерн-блоттинга (смотри, например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Vol. 3, Chapter 18 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)), хроматографии, предпочтительно высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), или других анализов, известных в данной области. Таким образом, анализы на детекцию могут включать стадии, такие как, но без ограничения, иммуноблоттинг, иммунодиффузию, иммуноэлектрофорез или иммунопреципитацию.

В определенных других вариантах осуществления способы по изобретению полезны для идентификации и лечения гематологических злокачественных опухолей, включая злокачественные опухоли, перечисленные выше, которые являются рефрактерными (то есть устойчивые или стали устойчивыми) к онкотерапевтическим терапиям первой линии.

Экспрессия или присутствие одного или более биомаркеров, описанных здесь, может быть также определено на уровне нуклеиновой кислоты. Методы оценки экспрессии на основе нуклеиновой кислоты хорошо известны в данной области и включают, например, определение уровня биомаркерной мРНК в биологическом образце. Во многих методах детекции экспрессии используется выделенная РНК. Любой способ выделения РНК, который не идет вразрез с выделением мРНК, может быть использован для очистки РНК из клеток крови (смотри, например, Ausubel et al., ed. (1987-1999) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York)). Дополнительно, большое количество образцов тканей может быть легко обработано с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области, таких как, например, одностадийный способ выделения РНК, описанный в патенте США № 4843155.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления детекцию биомаркера или другого представляющего интерес белка оценивают на уровне нуклеиновой кислоты с использованием зондов нуклеиновой кислоты. Термин "зонд нуклеиновой кислоты" относится к любой молекуле, которая способна к селективному связыванию со специально предназначенной для этого целевой молекулой нуклеиновой кислоты, например нуклеотидным транскриптом. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из подходящих биологических препаратов. Зонды могут быть специально сконструированы для мечения, например, радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, ферментом, хемилюминесцентной меткой, колориметрической меткой или другими метками или маркировками, которые описаны выше или известны в данной области. Примеры молекул, которые могут быть использованы в качестве зондов, включают, но без ограничения, РНК и ДНК.

Например, выделенная мРНК может быть использована в анализах гибридизации или амплифика-

ции, которые включают, но без ограничения, анализ по Саузерну и Нозерн-анализ, полимеразные цепные реакции и микрочипы с использованием зондов. Один метод детекции уровней мРНК включает контактирование выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК, кодируемой детектируемым геном. Зонд в виде нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, полноразмерную кДНК или ее участок, такой как олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере 7, 15, 30, 50, 100, 250 или 500 нуклеотидов и достаточный для специфической гибридизации в жестких условиях с мРНК или геномной ДНК, кодирующей биомаркер, биомаркер, описанный здесь выше. Гибридизация мРНК с зондом указывает на экспрессию биомаркера или другого представляющего интерес целевого белка.

В одном варианте осуществления мРНК иммобилизована на твердой подложке и контактирует с зондом, например, после проведения электрофореза выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлозная мембрана. В альтернативных вариантах осуществления зонд(ы) иммобилизованы на твердой подложке, и мРНК контактирует с зондом(ами), например, в массиве генных чипов. Опытный специалист легко адаптирует известные способы детекции мРНК для использования в детекции уровня мРНК, кодирующей биомаркеры или другие представляющие интерес белки.

Альтернативный метод определения уровня представляющей интерес мРНК в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты, например, с помощью RT-PCR (см., например, патент США № 4683202), лигазную цепную реакцию (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающуюся репликацию последовательностей (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), систему транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), использование Q-Бета Репликазы (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликацию по типу "катящегося кольца" (патент США № 5854033) или любые другие методы амплификации нуклеиновой кислоты с последующим детектированием амплифицированных молекул с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы детектирования особенно полезны для детекции молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень низких количествах. В конкретных аспектах изобретения экспрессию биомаркера оценивают с помощью количественной реакции RT-PCR (то есть системы TaqMan® System).

Уровни экспрессии представляющей интерес РНК могут отслеживаться с использованием мембраны-блота (например такой, которая используется в гибридизационном анализе, таком как Нозерн-анализ, дот-анализ и т.п.), или с помощью микролунок, пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены здесь путем ссылки. Детекция экспрессии может также включать использование зондов в виде нуклеиновых кислот в растворе.

В одном варианте осуществления изобретения для определения экспрессии или присутствия одного или более биомаркеров используются микрочипы. Микрочипы являются особенно подходящими для этой цели по причине воспроизводимости между различными экспериментами. ДНК-микрочипы обеспечивают один способ одновременного измерения уровней экспрессии большого числа генов. Каждый чип состоит из репродуцируемого изображения зондов захвата, закрепленных на твердой подложке. Меченая РНК или ДНК гибридизируется с комплементарными зондами на чипе и затем детектируется путем лазерного сканирования. Интенсивности гибридизации для каждого зонда на чипе определяются и переводятся в количественную величину, представляющую относительные уровни экспрессии генов. См., патент США № 6040138, 5800992 и 6020135, 6033860 и 6344316, которые включены здесь путем ссылки. Высокоплотные олигонуклеотидные массивы являются особенно полезными для определения профиля генной экспрессии для большого числа РНК в образце.

Методы синтеза этих чипов с использованием способов механического синтеза описаны, например, в патенте США 5384261, включенном здесь путем ссылки в полном объеме. Хотя плоская поверхность чипа является предпочтительной, чип может быть изготовлен на поверхности фактически любой формы или даже на множестве поверхностей. Чипы могут представлять собой пептиды или нуклеиновые кислоты на гранулах, гелях, полимерных поверхностях, волокнах, таких как оптические волокна, стекло или любом другом подходящем субстрате, смотри патент США №№ 5770358, 5789162, 5708153, 6040193 и 5800992, каждый из которых включен полностью здесь для всех целей. Чипы могут быть упакованы таким образом, чтобы обеспечить диагностику или другие манипуляции комплексного устройства. См., например, патенты США 5856174 и 5922591, включенные здесь путем ссылки.

Фармацевтические композиции/лекарственные формы

Фармацевтические композиции могут быть формулированы стандартными способами с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включая вспомогательные вещества и добавки, которые способствуют переработке активных соединений в препараты, которые можно применять фармацевтически. Надлежащая лекарственная форма зависит от выбранного способа введения. Любые хорошо известные методы, носители и вспомогательные вещества могут быть использованы в качестве пригодных и как понимается в данной области. Краткое описание фармацевтических композиций, описанных здесь, можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth

Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), содержание которых включено здесь путем отсылки в полном объеме.

Фармацевтическая композиция, использованная в данном контексте, относится к смеси соединения, описанного здесь, такого как, например, соединения Формулы D или второго агента с другими химическими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители, диспергирующие агенты, суспендирующие агенты, загустители и/или вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения в организм. При осуществлении на практике способов лечения или применения, обеспеченных здесь, терапевтически эффективные количества соединений, описанных здесь, вводятся в виде фармацевтической композиции млекопитающему, имеющему заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению. Предпочтительно млекопитающим является человек. Терапевтически эффективное количество может изменяться в широком диапазоне в зависимости от степени тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта, активности применяемого соединения и других факторов. Соединения можно применять отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами в качестве компонентов смесей.

В определенных вариантах осуществления композиции могут также включать один или более регулирующих pH агентов или буферных веществ, включая кислоты, такие как уксусная, борная, лимонная, молочная, фосфорная и соляная кислоты, основания, такие как гидроксид натрия, фосфат натрия, борат натрия, цитрат натрия, ацетат натрия, лактат натрия и трис-гидроксиметиламинометан; и буферы, такие как цитрат-/декстроза, бикарбонат натрия и хлорид аммония. Такие кислоты, основания и буферы включены в количестве, необходимом для поддержания pH композиции в приемлемом диапазоне.

В других вариантах осуществления композиции также могут включать одну или более солей в количестве, необходимом для приведения осмолярности композиции в приемлемый диапазон. Такие соли включают соли, содержащие катионы натрия, калия или аммония, и хлорид-, цитрат-, аскорбат-, борат-, фосфат-, бикарбонат-, сульфат-, тиосульфат- или бисульфит-анионы; пригодные соли включают хлорид натрия, хлорид калия, тиосульфат натрия, бисульфит натрия и сульфат аммония.

Термин "фармацевтическая комбинация", используемый здесь, означает продукт, который получен в результате смешивания или объединения более чем одного активного ингредиента, и включает как фиксированные, так и нефиксированные комбинации активных ингредиентов. Термин "фиксированная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например описанное здесь соединение и сопутствующий агент, вводят пациенту одновременно в форме единого целого или дозы. Термин "нефиксированная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например, описанное здесь соединение и сопутствующий агент, вводят пациенту в виде отдельных единиц одновременно, параллельно или последовательно без конкретных ограничений по времени, при этом такое введение обеспечивает эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также относится к коктейльной терапии, например, введению трех или более активных ингредиентов.

Фармацевтические лекарственные формы, описанные здесь, можно вводить субъекту различными способами, включая, но без ограничения, пероральный, парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутримышечный), интраназальный, буккальный, местный, ректальный или трансдермальный способы введения. Фармацевтические композиции, описанные здесь, включают, но без ограничения, водные жидкие дисперсии, самоэмульгирующиеся дисперсии, твердые растворы, липосомальные дисперсии, аэрозоли, твердые лекарственные формы, порошки, лекарственные формы с немедленным высвобождением, лекарственные формы с контролируемым высвобождением, быстроплавящиеся лекарственные формы, таблетки, капсулы, пилюли, лекарственные формы с отсроченным высвобождением, лекарственные формы с продленным высвобождением, лекарственные формы с импульсным высвобождением, лекарственные формы, состоящие из множества частиц, и смешанные лекарственные формы с немедленным и контролируемым высвобождением.

Фармацевтические композиции, включая описанное здесь соединение, могут быть изготовлены стандартными способами, такими как, в качестве примера только, обычное смешивание, растворение, грануляция, дражирование, растирание в порошок, эмульгирование, инкапсулирование, захват или прессование.

"Противовспенивающие агенты" уменьшают пенообразование во время обработки, которое может привести к коагуляции водных дисперсий, пузырькам в конечной оболочке или в целом ухудшить процесс обработки. Иллюстративные противовспенивающие агенты включают силиконовые эмульсии или сорбит сесквиолеат.

"Антиоксиданты" включают, например, бутилированный гидрокситолуол (БНТ), аскорбат натрия, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия и токоферол. В определенных вариантах осуществления антиоксиданты повышают химическую стабильность, если это необходимо.

В определенных вариантах осуществления композиции, обеспеченные здесь, могут также включать один или более консервантов для ингибирования микробной активности. Пригодные консерванты вклю-

чают содержащие ртуть вещества, такие как мерфен и тиомерсал; стабилизированный диоксид хлора; и четвертичные аммониевые соединения, такие как бензалкония хлорид, цетилметиламмония бромид и цетилпиридиния хлорид.

Лекарственные формы, описанные здесь, могут быть улучшены с помощью антиоксидантов, металл-хелатирующих агентов, тиолсодержащих соединений и других общих стабилизирующих агентов. Примеры таких стабилизирующих агентов включают, но без ограничения: (a) примерно от 0.5 до примерно 2% мас./об. глицерина, (b) примерно от 0.1 до примерно 1% мас./об. метионина, (c) примерно от 0.1 до примерно 2% мас./об. монотиоглицерина, (d) примерно от 1 до примерно 10 мМ EDTA, (e) примерно от 0.01 до примерно 2% мас./об. аскорбиновой кислоты, (f) от 0.003 до примерно 0.02% мас./об. полисорбата-80, (g) от 0.001 до примерно 0.05% мас./об. полисорбата-20, (h) аргинин, (i) гепарин, (j) сульфат декстрана, (k) циклодекстрины, (l) пентозанполисульфат и другие гепариноиды, (m) бивалентные катионы, такие как катионы магния и цинка; или (n) их комбинации.

"Связующие вещества" наделяют когезивными свойствами и включают, например, альгиновую кислоту и ее соли; производные целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза (например, Methocel®), гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза (например, Klucel®), этилцеллюлоза (например, Ethocel®) и микрокристаллическая целлюлоза (например, Avicel®); микрокристаллическую декстрозу; амилозу; алюмосиликат магния; кислоты полисахаридов; бентониты; желатин; сополимер поливинилпирролидона и винилацетата; кросповидон; повидон; крахмал; прежелатинизированный крахмал; трагант, декстрин, сахар, такой как сахароза (например, D-рас®), глюкоза, декстроза, патока, маннит, сорбит, ксилит (например, Xylitab) и лактоза; природную или синтетическую камедь, такую как аравийская камедь, трагантовая камедь, гхатти камедь, слизь шелухи (isapol husks), поливинилпирролидон (например, Polyvidone® CL, Kollidon® CL, Polyplasdone® XL-10), арабалактан лиственницы, Veegum®, полиэтиленгликоль, воски, альгинат натрия и т.п.

"Носитель" или "вещество-носитель" включает любые обычно применяемые в фармацевтике вспомогательные вещества и должны быть выбраны на основе совместимости с соединениями, раскрытыми здесь, такими как соединения любой Формулы D и второй агент, и характеристик профиля высвобождения желаемой лекарственной формы. Примеры веществ-носителей включают, например, связующие вещества, суспендирующие агенты, дезинтегрирующие агенты, наполнители, поверхностно-активные вещества, солюбилизаторы, стабилизаторы, лубриканты, смачивающие агенты, разбавители и т.п.

"Фармацевтически приемлемые вещества-носители" могут включать, но без ограничения, аравийскую камедь, желатин, коллоидный диоксид кремния, глицерофосфат кальция, лактат кальция, мальтодекстрин, глицерин, силикат магния, поливинилпирролидон (PVP), холестерин, сложные эфиры холестерина, казеинат натрия, соевый лецитин, таурохолевую кислоту, фосфотидилхолин, хлорид натрия, трикальцийфосфат, дикалийфосфат, целлюлозу и конъюгаты целлюлозы, сахара, натрия стеарилактат, каррагенан, моноглицерид, диглицерид, прежелатинизированный крахмал и т.п. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).

"Диспергирующие агенты" и/или "модулирующие вязкость агенты" включают вещества, которые контролируют диффузию и однородность лекарственного средства в жидкой среде, или в способе грануляции, или в способе смешивания. В некоторых вариантах осуществления такие агенты также облегчают эффективность нанесения оболочки или эрозии матрицы. Примеры агентов, способствующих диффузии/диспергирующих агентов включают, например, гидрофильные полимеры, электролиты, Tween -60 или -80, PEG, поливинилпирролидон (PVP; коммерчески известный как Plasdone®) и диспергирующие агенты на основе углеводов, такие как, например, гидроксипропилцеллюлозы (например, HPC, HPC-SL и HPC-L), гидроксипропилметилцеллюлозы (например, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M и HPMC K100M), натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCAS), некристаллическая целлюлоза, алюмосиликат магния, триэтаноламин, поливиниловый спирт (PVA), сополимер винилпирролидона и винилацетата (S630), полимер на основе 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенола с этиленоксидом и формальдегидом (также известный как тилоксапол), полуксамеры (например, Pluronic F68®, F88® и F108®, которые являются блок-сополимерами этиленоксида и пропиленоксида); и полуксамины (например, Tetronic 908®, также известный как Poloxamine 908®, который является тетрафункциональным блоксополимером, полученным при последовательном добавлении пропиленоксида и этиленоксида к этилендиамину (BASF Corporation, Parsippany, N.J.)), поливинилпирролидон K12, поливинилпирролидон K17, поливинилпирролидон K25 или поливинилпирролидон K30, сополимер поливинилпирролидона и винилацетата (S-630), полиэтиленгликоль, например полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу примерно от 300 до примерно 6000, или примерно от 3350 до примерно 4000, или примерно от 7000 до примерно 5400, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, метилцел-

люлозу, полисорбат-80, альгинат натрия, камеди, такие как, например, трагантовая камедь, аравийская камедь, гуаровая камедь, ксантаны, включая ксантановую камедь, сахара, целлюлозы, такие как, например, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, полисорбат-80, альгинат натрия, полиэтоксилированный сорбитан монолаурат, повидон, карбомеры, поливиниловый спирт (PVA), альгинаты, хитозаны и их комбинации. Пластификаторы, такие как целлюлоза или три-этилцеллюлоза, также могут быть использованы в качестве диспергирующих агентов. Диспергирующие агенты, особенно полезные в липосомальных дисперсиях и самоэмульгирующихся дисперсиях, представляют собой димироитоилфосфатидилхолин, природный фосфатидилхолин из яиц, природный фосфатидилглицерин из яиц, холестерин и изопропилмириститат.

Комбинации одного или более агентов, способствующих эрозии, с одним или более агентов, способствующих диффузии, могут быть также использованы в композициях по настоящему изобретению.

Термин "разбавитель" относится к химическим соединениям, которые используют для разбавления представляющего интерес соединения перед доставкой. Разбавители можно также использовать для стабилизации соединений, так как они могут обеспечить более стабильное окружение. Соли, растворенные в буферных растворах (которые также могут обеспечить контроль или поддержание pH), используются в качестве разбавителей в данной области, включая, но без ограничения, забуференный фосфатом солевой раствор. В определенных вариантах осуществления разбавители увеличивают объем композиции для содействия прессованию или создания массы, достаточной для гомогенного перемешивания для наполнения капсул. Такие соединения включают, например, лактозу, крахмал, маннит, сорбит, декстрозу, микрокристаллическую целлюлозу, такую как Avicel®, двухосновный фосфат кальция, дикальция фосфат дигидрат, трикальцийфосфат, фосфат кальция, безводную лактозу, высушенную распылением лактозу, прежелатинизированный крахмал, прессуемый сахар, такой как Di-Pac® (Amstar); маннит, гидроксипропилметилцеллюлозу, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы, разбавители на основе сахарозы, кондитерский сахар; моноосновный моногидрат сульфата кальция, дигидрат сульфата кальция; тригидрат лактата кальция, декстраты; гидролизованные твердые вещества злаков, амилосу; порошковую целлюлозу, карбонат кальция; глицин, каолин; маннит, хлорид натрия; инозитол, бентонит и т.п.

Термин "дезинтегрировать" включает как растворение, так и диспергирование лекарственной формы при контакте с желудочно-кишечной жидкостью. "Дезинтегрирующие агенты или дезинтеграторы" облегчают распад или дезинтеграцию вещества. Примеры дезинтегрирующих агентов включают крахмал, например крахмал природного происхождения, такой как крахмал зерновых или картофельный крахмал, прежелатинизированный крахмал, такой как, например, National 1551 или Amijel®, или натрия крахмалгликолят, такой как Promogel® или Explotab®, целлюлозу, такую как древесные продукты, метилкристаллическая целлюлоза, например, Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel® PH105, Elcema® P100, Emcoscel®, Vivacel®, Ming Tia® и Solka-Floc®, метилцеллюлоза, кроскармеллоза или поперечносшитая целлюлоза, такая как поперечно-сшитая натрийкарбоксиметилцеллюлоза (Ac-Di-Sol®), поперечно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза или поперечно-сшитая кроскармеллоза, поперечно-сшитый крахмал, такой как натрия крахмалгликолят; поперечно-сшитый полимер, такой как кросповидон, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, альгинат, такой как альгиновая кислота или соль альгиновой кислоты, такая как альгинат натрия, глину, такую как Veegum® HV (алюмосиликат магния), камедь, такую как агар, гуаровая камедь, камедь плодов рожкового дерева, камедь карайи, пектин или трагантовая камедь, натрия крахмалгликолят, бентонит, природную губку, поверхностно-активное вещество, смолу, такую как катионообменная смола, мякоть цитруса, натрия лаурилсульфат, натрия лаурилсульфат в комбинации с крахмалом и т.п.

"Абсорбция лекарственного средства" или "абсорбция" обычно относится к процессу транспорта лекарственного средства из области введения лекарственного средства через барьер в кровеносный сосуд или участок действия, например лекарственное средство движется из желудочно-кишечного тракта в портальную вену или лимфатическую систему.

"Энтеросолюбильное покрытие" представляет собой вещество, которое сохраняется, по существу, в неизменном виде в желудке, но растворяется и высвобождает лекарственное средство в тонкой кишке или толстой кишке. Как правило, энтеросолюбильное покрытие включает полимерное вещество, которое препятствует высвобождению в среде с низкими значениями pH в желудке, но которое ионизируется при более высоких значениях pH, обычно pH от 6 до 7 и, таким образом, растворяется в достаточной степени в тонкой кишке или толстой кишке с высвобождением там активного агента.

"Вещества, способствующие эрозии" включают вещества, которые регулируют эрозию конкретного вещества в желудочно-кишечной жидкости. Вещества, способствующие эрозии, в целом известны специалистам в данной области. Примеры веществ, способствующих эрозии, включают, в частности, гидрофильные полимеры, электролиты, белки, пептиды и аминокислоты.

"Наполнители" включают соединения, такие как лактоза, карбонат кальция, фосфат кальция, двузамещенный фосфат кальция, сульфат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, порошковая целлюлоза, декстроза, декстраты, декстран, крахмалы, прежелатинизированный крахмал, сахароза, ксилит, лактитол, маннит, сорбит, хлорид натрия, полиэтиленгликоль и т.п.

"Вкусовые агенты" и/или "подсластители", применяемые в лекарственных формах, описанных здесь, включают, например, сироп акации, ацесульфам калия, алитам, анис, яблоко, аспартам, банан, баварские сливки, ягоды, черную смородину, ириски, цитрат кальция, камфору, карамель, вишню, вишню со сливками, шоколад, корицу, "жевательную резинку", цитрус, цитрусовый пунш, цитрусовые сливки, сахарную вату, какао, колу, свежую вишню, свежий цитрус, цикламат, циламат, декстрозу, эвкалипт, эвгенол, фруктозу, фруктовый пунш, имбирь, глицирретинат, сироп солодки (лакрица), виноград, грейпфрут, мед, изомальт, лимон, лайм, лимон со сливками, моноаммоний глицирризинат (MagnaSweet®), мальтол, маннит, клен, алтей, ментол, мяту со сливками, смесь ягод, неогесперидин DC, неотам, апельсин, грушу, персик, перечную мяту, перечную мяту со сливками, порошок Prosweet®, малину, рутбир, ром, сахарин, сафрол, сорбит, зеленую мяту, зеленую мяту со сливками, землянику, землянику со сливками, стевию, сукралозу, сахарозу, сахарин натрия, сахарин, аспартам, ацесульфам калия, маннит, талин, силитол, сукралозу, сорбит, швейцарские сливки, тагатозу, мндарин, тауматин, "гутти-фрутти", ваниль, грецкий орех, арбуз, дикую вишню, гаультерию, ксилитол или любую комбинацию таких ароматизаторов, например анис-ментол, вишня-анис, корица-апельсин, вишня-шоколад, шоколад-мята, мед-лимон, лимон-лайм, лимон-мята, ментол-эвкалипт, апельсин-сливки, ваниль-мята и их смеси.

"Лубриканты" и "глитанты" представляют собой соединения, которые предотвращают, уменьшают или ингибируют слипание или трение веществ. Примеры лубрикантов включают, например, стеариновую кислоту, гидроксид кальция, тальк, натрия стеарилфумерат, углеводороды, такие как минеральное масло или гидрогенизированное растительное масло, такое как гидрогенизированное соевое масло (Stereotex®), высшие жирные кислоты и соли щелочных и щелочно-земельных металлов, таких как алюминий, кальций, магний, цинк, стеариновую кислоту, стеараты натрия, глицерин, тальк, воски, Stearowet®, борную кислоту, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, лейцин, полиэтиленгликоль (например, PEG-4000) или метоксиполиэтиленгликоль, такой как Carbowax™, олеат натрия, бензоат натрия, глицерилбенгнат, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия, коллоидный кремнезем, такой как Syloid™, Cab-O-Sil®, крахмал, такой как зерновой крахмал, силиконовое масло, поверхностно-активное вещество и т.п.

"Измеряемая концентрация в сыворотке" или "измеряемая концентрация в плазме" описывает концентрацию в сыворотке крови или плазме крови, обычно измеряемую в мг, мкг или нг терапевтического агента на мл, дл или л сыворотки крови, абсорбированную в кровоток после введения. Измеряемые концентрации в плазме, использованные в данном контексте, обычно измеряются в нг/мл или мкг/мл.

"Фармакодинамика" относится к факторам, которые определяют биологический ответ, наблюдаемый в зависимости от концентрации лекарственного средства в месте действия.

"Фармакокинетика" относится к факторам, которые определяют достижение и поддержание соответствующей концентрации лекарственного средства в месте действия.

"Пластификаторы" представляют собой соединения, используемые для смягчения микроинкапсулирующего материала или пленочных покрытий с целью уменьшения их хрупкости. Пригодные пластификаторы включают, например, полиэтиленгликоли, такие как PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 и PEG 800, стериную кислоту, пропиленгликоль, олеиновую кислоту, триэтилцеллюлозу и триацетин. В некоторых вариантах осуществления пластификаторы могут также функционировать в качестве диспергирующих агентов или увлажняющих средств.

"Солюбилизаторы" включают соединения, такие как триацетин, триэтилцитрат, этилолеат, этилкаприлат, лаурилсульфат натрия, докзат натрия, витамин E TPGS, диметилацетамид, N-метилпирролидон, N-гидроксиэтилпирролидон, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилциклодекстрины, этанол, н-бутанол, изопропиловый спирт, холестерин, соли желчных кислот, полиэтиленгликоль 200-600, гликофутол, транскутол, пропиленгликоль и диметилизосорбид и т.п.

"Стабилизаторы" включают соединения, такие как любые антиокислительные агенты, буферы, кислоты, консерванты и т.п.

"Стационарное состояние", использованное в данном контексте, представляет собой состояние, при котором количество введенного лекарственного средства равно количеству выведенного лекарственного средства в течение одного интервала между дозированиями, что приводит к "плато" или постоянному воздействию лекарственного средства в плазме.

"Суспендирующие агенты" включают соединения, такие как поливинилпирролидон, например поливинилпирролидон K12, поливинилпирролидон K17, поливинилпирролидон K25 или поливинилпирролидон K30, сополимеры винилпирролидона и винилацетата (S630), полиэтиленгликоль, например, полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу примерно от 300 до примерно 6000, или от примерно 3350 до примерно 4000, или от примерно 7000 до примерно 5400, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, ацетат-стеарат гидроксиметилцеллюлозы, полисорбат-80, гидроксипропилцеллюлоза, альгинат натрия, камеди, такие как, например, трагантовая камедь и аравийская камедь, гуаровая камедь, ксантаны, включая ксантановую камедь, сахара, целлюлозы, такие как, например, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, полисорбат-80, альгинат натрия, полиэтоксифилованный монолаурат сорбита, повидон и т.п.

"Поверхностно-активные вещества" включают соединения, такие как лаурилсульфат натрия, докүзат натрия, Твин-60 и -80, триацетин, витамин Е TPGS, моноолеат сорбита, полиоксиэтилен сорбита моноолеат, полисорбаты, полаксомеры, соли желчных кислот, глицерина моностеарат, сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, например Pluronic® (BASF), и т.п. Некоторые другие поверхностно-активные вещества включают эфиры полиоксиэтилена и глицеридов жирных кислот, и растительные масла, например полиоксиэтилен (60) гидрогенизированное касторовое масло; и алкиловые эфиры полиоксиэтилена и алкилфениловые эфиры, например октоксинал 10, октоксинал 40. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активные вещества могут быть включены для повышения физической стабильности или в других целях.

"Повышающие вязкость агенты" включают, например, метилцеллюлозу, ксантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, карбомер, поливиниловый спирт, альгинаты, аравийскую камедь, хитозаны и их комбинации.

"Увлажняющие средства" включают соединения, такие как олеиновая кислота, глицерина моностеарат, моноолеат сорбита, сорбитан монолаурат, триэтаноламин олеат, моноолеат полиоксиэтилен сорбита, монолаурат полиоксиэтилен сорбита, докүзат натрия, олеат натрия, лаурилсульфат натрия, триацетин, Твин-80, витамин Е TPGS, аммониевые соли и т.п.

Лекарственные формы

Композиции, описанные здесь, могут быть формулированы для введения пациенту любым подходящим способом, включая, но без ограничения, пероральный, парентеральный (например, внутривенный, подкожный или внутримышечный), буккальный, интраназальный, ректальный или трансдермальный способы введения. Термин "субъект", использованный в данном контексте, означает животное, предпочтительно млекопитающее, включая человека или не являющееся человеком животное. Термины "пациент" и "субъект" могут использоваться взаимозаменяемо.

Кроме того, фармацевтические композиции, описанные здесь, которые включают соединение Формулы D или второго агента, могут быть формулированы в виде любой подходящей лекарственной формы, включая, но без ограничения, водные пероральные дисперсии, жидкости, гели, сиропы, элексиры, взвеси, суспензии и т.п. для перорального проглатывания пациентом, подлежащим лечению, твердые пероральные лекарственные формы, аэрозоли, лекарственные формы с контролируемым высвобождением, быстроплавящиеся лекарственные формы, шипучие лекарственные формы, лиофилизированные лекарственные формы, таблетки, порошки, пилюли, драже, капсулы, лекарственные формы с отсроченным высвобождением, лекарственные формы с продленным высвобождением, лекарственные формы с импульсным высвобождением, лекарственные формы, состоящие из множества частиц, и смешанные лекарственные формы с немедленным высвобождением и контролируемым высвобождением.

Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем смешивания одного или более твердых вспомогательных веществ с одним или более из соединений, описанных здесь, необязательно с помолем полученной смеси и изготовлением смеси гранул после добавления пригодных добавок, если это необходимо, с получением таблеток или сердцевин драже. Пригодные вспомогательные вещества включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; целлюлозные компоненты, такие как, например, зерновой крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагантовую камедь, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу; или другие, такие как: поливинилпирролидон (PVP или повидон) или фосфат кальция. При желании могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как поперечно-сшитая кроскармеллоза натрия, поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота, или ее соль, такая как альгинат натрия.

Ядра драже снабжены пригодными оболочками. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахара, которые необязательно могут содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, карбополюный гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, лакировочный раствор и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Красители или пигменты могут быть добавлены в покрытия таблеток или драже для идентификации или для характеристики различных комбинаций доз активного соединения.

Фармацевтические препараты, которые можно применять перорально, включают твердые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие, герметично закрытые капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы содержат активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, и/или лубрикантами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как нелетучие масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Дополнительно могут быть добавлены стабилизаторы. Все лекарственные формы для перорального введения должны быть в дозировках, пригодных для такого введения.

В некоторых вариантах осуществления твердые лекарственные формы, раскрытые здесь, могут быть представлены в форме таблетки (включая суспензионную таблетку, быстрорасплавляющуюся таб-

летку, распадающуюся под действием желчных кислот таблетку, быстрораспадающуюся таблетку, шипучую таблетку или каплет), пилюли, порошка (включая стерильный расфасованный порошок, порошок для самостоятельного дозирования или шипучий порошок), капсулы (включая мягкую и твердую капсулы, например, капсулы, изготовленные из желатина животного происхождения или НРМС растительного происхождения, или "разбрызгивающиеся капсулы»), твердой дисперсии, твердого раствора, биоразлагаемой лекарственной формы, лекарственных форм с контролируемым высвобождением, лекарственных форм с импульсным высвобождением, лекарственных форм, состоящих из множества частиц, гранул или аэрозоля. В других вариантах осуществления фармацевтическая лекарственная форма представлена в форме порошка. В еще других вариантах осуществления фармацевтическая лекарственная форма представлена в форме таблетки, включая, но без ограничения, быстроплавящиеся таблетки. Кроме того, фармацевтические лекарственные формы, описанные здесь, можно вводить в виде одной капсулы или в виде лекарственной формы, состоящей из множества капсул. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические лекарственные формы вводят в виде двух или трех, или четырех капсул или таблеток.

В некоторых вариантах осуществления твердые лекарственные формы, например, таблетки, шипучие таблетки и капсулы изготовлены путем смешивания частиц соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) с одним или более фармацевтическими вспомогательными веществами с образованием сыпучей смешанной композиции. Когда эти сыпучие смешанные композиции называют гомогенными, это означает, что частицы соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) равномерно распределены по всей композиции таким образом, что композиция может быть легко подразделена на стандартные лекарственные формы одинаковой эффективности, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Индивидуальные стандартные лекарственные формы могут также включать пленочные покрытия, которые разрушаются при пероральном проглатывании или при контакте с разбавителем. Эти лекарственные формы могут быть изготовлены с помощью обычных фармакологических методов.

Обычные фармакологические методы включают, например, один или комбинацию способов: (1) сухое перемешивание, (2) прямое прессование, (3) помол, (4) сушку или безводную грануляцию, (5) влажную грануляцию или (6) спекание. См., например, Lachman et al., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* (1986). Другие способы включают, например, сушку распылением, дражирование, гранулирование из расплава, гранулирование, сушка распылением или нанесение покрытия в псевдооживленном слое (например, насаивание Вюрстера), тангенциальное нанесение покрытия, поверхностное распыление, таблетирование, экструдирование и т.п.

Фармацевтические твердые лекарственные формы, описанные здесь, могут включать соединение, описанное здесь, и одну или более фармацевтически приемлемых добавок, таких как совместимый носитель, связующее, агент-наполнитель, суспендирующий агент, вкусовая добавка, подсластитель, дезинтегрирующий агент, диспергирующий агент, поверхностно-активное вещество, лубрикант, краситель, разбавитель, солубилизатор, увлажняющий агент, пластификатор, стабилизатор, усилитель проникновения, смачивающий агент, противоспенивающий агент, антиоксидант, консервант, или одну или более их комбинацию. В еще других аспектах, с использованием стандартных методов нанесения покрытия, таких, которые описаны в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 20th Edition (2000), обеспечено пленочное покрытие вокруг лекарственной формы соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6). В одном варианте осуществления некоторые или все частицы соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) являются покрытыми. В другом варианте осуществления некоторые или все частицы соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) являются микроинкапсулированными. В еще других вариантах осуществления частицы соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) не являются микроинкапсулированными и являются непокрытыми.

Пригодные носители для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, аравийскую камедь, желатин, коллоидный диоксид кремния, глицерофосфат кальция, лактат кальция, мальтодекстрин, глицерин, силикат магния, казеинат натрия, соевый лецитин, хлорид натрия, трикальцийфосфат, дикалия фосфат, стеароил лактилат натрия, каррагенан, моноглицерид, диглицерид, прежелатинизированный крахмал, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат стеарат, сахарозу, микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, маннит и т.п.

Пригодные наполнители для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, лактозу, карбонат кальция, фосфат кальция, двухосновный фосфат кальция, сульфат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, целлюлозный порошок, декстрозу, декстраты, декстран, крахмалы, прежелатинизированный крахмал, гидроксипропилметилцеллюлозу (НРМС), фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСАС), сахарозу, ксилит, лактитол, маннит, сорбит, хлорид натрия, полиэтиленгликоль и т.п.

Для высвобождения соединения по любой из Формулы (A1-A6), Формулы (B1-B6), Формулы (C1-C6) или Формулы (D1-D6) из матрицы твердой лекарственной формы с наибольшей эффективностью, в

лекарственных формах часто используют дезинтеграторы, особенно в тех случаях, когда лекарственные формы прессуют со связующими веществами. Дезинтеграторы способствуют разрушению матрицы лекарственной формы благодаря набуханию или капиллярным эффектам, когда лекарственная форма впитывает влагу. Пригодные дезинтеграторы для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, природные крахмалы, такие как зерновой крахмал или картофельный крахмал, прежелатинизированный крахмал, такой как National 1551 или Amijel®, или натрия гликоляткарахмал, такой как Promogel® или Explotab®, целлюлозу, такую как древесный продукт, метилированная кристаллическая целлюлоза, например Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel® PH105, Elcema® P100, Emcocoel®, Vivacel®, Ming Tia® и Solka-Floc®, метилцеллюлоза, кроскармеллоза или поперечносшитая целлюлоза, такая как поперечно-сшитая натрийкарбоксиметилцеллюлоза (Ac-Di-Sol®), поперечно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза или поперечно-сшитая кроскармеллоза, поперечно-сшитый крахмал, такой как гликоляткарахмал натрия, поперечно-сшитый полимер, такой как кросповидон, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, альгинат, такой как альгиновая кислота или соль альгиновой кислоты, такая как альгинат натрия, глину, такую как Veegum® HV (алюмосиликат магния), камедь, такую как агар, гуаровую камедь, камедь плодов рожкового дерева, камедь карайи, пектин или трагант, гликоляткарахмал натрия, бентонит, природную губку, поверхностно-активное вещество, смолу, такую как катионообменная смола, цитрусовую пульпу, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия в комбинации с крахмалом и т.п.

Связующие вещества наделяют когезивностью твердые пероральные лекарственные формы: в отношении лекарственной формы в виде капсулы, заполненной порошком, связующие вещества способствуют формированию заполняющей массы, которая может быть помещена в капсулы с мягкой или твердой оболочкой, и в отношении лекарственных форм в виде таблеток, связующие вещества обеспечивают целостность таблетки после прессования и однородность смеси до стадии прессования или заполнения. Материалы, пригодные для использования в качестве связующих веществ в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу (например, Methocel®), гидроксипропилметилцеллюлозу (например, Hypromellose USP Pharmaccoat-603, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы (Aquate HS-LF и HS), гидроксизетилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу (например, Klucel®), этилцеллюлозу (например, Ethocel®) и микрокристаллическую целлюлозу (например, Avicel®), микрокристаллическую декстрозу, амилозу, алюмосиликат магния, кислоты полисахаридов, бентониты, желатин, сополимер поливинилпирролидона и винилацетата, кросповидон, повидон, крахмал, прежелатинизированный крахмал, трагант, декстрин, сахар, такой как сахароза (например, Dipac®), глюкоза, декстроза, меласса, маннит, сорбит, ксилит (например, Xylitab®), лактоза, природную или синтетическую камедь, такую как аравийская камедь, трагантовая камедь, камедь гхатти, экстракт слизи шелухи isapol husks, крахмал, поливинилпирролидон (например, Povidone® CL, Kollidon® CL, Polyplasdone® XL-10 и Povidone® K-12), арабогалактан лиственницы, Veegum®, полиэтиленгликоль, воски, альгинат натрия, и т.п.

Как правило, в лекарственных формах в виде желатиновых капсул, заполненных порошком, содержание связующих веществ составляет 20-70%. Содержание связующих веществ в лекарственных формах в виде таблеток изменяется в зависимости от использования прямого прессования, влажной грануляции, вальцевания или использования других вспомогательных веществ, таких как наполнители, которые сами по себе могут действовать в качестве умеренного связующего. Специалисты в данной области могут определить уровень содержания связующего для лекарственных форм, но, как правило, в лекарственных формах в виде таблеток уровень содержания связующего составляет до 70%.

Пригодные лубриканты или глйданты для применения в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, стеариновую кислоту, гидроксид кальция, тальк, кукурузный крахмал, стеарилфумерат натрия, соли щелочных и щелочно-земельных металлов, таких как алюминий, кальций, магний, цинк, стеариновую кислоту, стеараты натрия, стеарат магния, стеарат цинка, воски, Stearowet®, борную кислоту, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, лейцин, полиэтиленгликоль или метоксиполиэтиленгликоль, такой как Carbowax™, PEG 4000, PEG 5000, PEG 6000, пропиленгликоль, олеат натрия, глицерил бегенат, глицерил палмитостеарат, глицерил бензоат, лаурилсульфат магния или натрия, и т.п.

Пригодные разбавители для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, сахара (включая лактозу, сахарозу и декстрозу), полисахариды (включая декстраты и мальтодекстрин), полиолы (включая маннит, ксилитол и сорбит), циклодекстрины и т.п.

Термин "водонерастворимый разбавитель" представляет соединения, обычно используемые при формулировании фармацевтических препаратов, такие как фосфат кальция, сульфат кальция, крахмалы, модифицированные крахмалы и микрокристаллическая целлюлоза, и микроцеллюлоза (например, имеющая плотность примерно 0.45 г/см³, например, авицел, полошковая целлюлоза), и тальк.

Пригодные смачивающие агенты для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, например, олеиновую кислоту, глицерилмоностеарат, сорбитанмоноолеат, сорбитанмонолаурат, триэтаноламин олеат, полиоксиэтилен сорбитанмоноолеат, полиоксиэтилен сорбитан моно-

лаурат, четвертичные аммониевые соединения (например, Polyquat 10®), олеат натрия, лаурилсульфат натрия, стеарат магния, докзат натрия, триацетин, витамин E TPGS и т.п.

Пригодные поверхностно-активные вещества для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, например, лаурилсульфат натрия, сорбитанмоноолеат, полиоксиэтилен сорбитанмоноолеат, полисорбаты, полаксомеры, соли желчных кислот, глицерилмоностеарат, сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, например Pluronic® (BASF), и т.п.

Пригодные суспендирующие агенты для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, но без ограничения, поливинилпирролидон, например поливинилпирролидон K12, поливинилпирролидон K17, поливинилпирролидон K25 или поливинилпирролидон K30, полиэтиленгликоль, например полиэтиленгликоль может иметь молекулярную массу примерно от 300 до 6000, или примерно от 3350 до примерно 4000, или примерно от 7000 до примерно 5400, сополимер винилпирролидона и винилацетата (S630), натрийкарбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, полисорбат-80, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, камеди, такие как, например, трагантиновая камедь и аравийская камедь, гуаровая камедь, ксантаны, включая ксантановую камедь, сахара, целлюлозы, такие как, например, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, полисорбат-80, альгинат натрия, полиэтилоксидированный сорбитан монолаурат, полиэтилоксидированный сорбитан монолаурат, повидон и т.п.

Пригодные антиоксиданты для использования в твердых лекарственных формах, описанных здесь, включают, например, бутилированный гидрокситолуол (БНТ), аскорбат натрия и токоферол.

Следует учесть, что добавки, используемые в твердых лекарственных формах, описанных здесь, существенно пересекаются. Таким образом, перечисленные выше добавки должны рассматриваться только как иллюстративные и не ограничивающие примеры типов добавок, которые могут быть включены в твердые лекарственные формы, описанные здесь. Количество таких добавок может быть без труда определено специалистами в данной области в соответствии с конкретными желаемыми свойствами.

В других вариантах осуществления один или более слоев фармацевтической лекарственной формы являются пластифицированными. В качестве примера, пластификатор обычно представляет собой твердое вещество или жидкость с высокой температурой кипения. Пригодные пластификаторы могут быть добавлены в количестве примерно от 0.01 до примерно 50 мас. % (мас./мас.) композиции покрытия. Пластификаторы включают, но без ограничения, диэтилфталат, сложные эфиры цитрата, полиэтиленгликоль, глицерин, ацетилизированные глицериды, триацетин, полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль, триэтилцитрат, дибутилсебакат, стеариновую кислоту, стеарол, стеарат и касторовое масло.

Прессованные таблетки представляют собой твердые лекарственные формы, полученные путем прессования объемной смеси композиций, описанных выше. В различных вариантах осуществления прессованные таблетки, которые разработаны для растворения во рту, будут включать один или более вкусовых агентов. В других вариантах осуществления прессованные таблетки будут включать пленку, окружающую конечную прессованную таблетку. В некоторых вариантах осуществления пленочное покрытие может обеспечить отсроченное высвобождение соединения Формулы D или второго агента из лекарственной формы. В других вариантах осуществления пленочное покрытие содействует удобству для пациента (например, покрытия Opatry® или сахарные покрытия). Пленочные покрытия, в том числе Opatry®, обычно составляют примерно от 1 до примерно 3 мас. % таблетки. В других вариантах осуществления прессованные таблетки включают одно или более вспомогательных веществ.

Капсула может быть приготовлена, например, путем помещения объемной смеси композиции соединения Формулы D или второго агента, описанного выше, внутрь капсулы. В некоторых вариантах осуществления композиции (неводные суспензии и растворы) помещены в мягкую желатиновую капсулу. В других вариантах осуществления композиции помещены в стандартные желатиновые капсулы или нежелатиновые капсулы, такие как капсулы, содержащие НРМС. В других вариантах осуществления композиция помещена в разбрызгиваемую капсулу, при этом капсула может разбухать целиком или может открываться и содержимое разбрызгиваться на пищу до приема пищи. В некоторых вариантах осуществления терапевтическая доза разделена на множество капсул (например, две, три или четыре). В некоторых вариантах осуществления вся доза композиции доставляется в форме капсулы.

В различных вариантах осуществления частицы соединения Формулы D или второго агента и одно или более вспомогательных веществ смешивают в сухом состоянии и прессуют в массу, такую как таблетка, имеющая твердость, достаточную для обеспечения фармацевтической композиции, которая по существу дезинтегрирует в течение менее чем примерно 30 мин, менее чем примерно 35 мин, менее чем примерно 40 мин, менее чем примерно 45 мин, менее чем примерно 50 мин, менее чем примерно 55 мин или менее чем примерно 60 мин после перорального введения, высвобождая, таким образом, композицию в желудочно-кишечную жидкость.

В другом аспекте лекарственные формы могут включать лекарственные формы в виде микрокапсул. В некоторых вариантах осуществления один или более других совместимых материалов присутствуют в материале для микроинкапсуляции. Примеры материалов включают, но без ограничения, моди-

фикаторы pH, вещества, способствующие эрозии, противовспенивающие агенты, антиоксиданты, вкусовые агенты и материалы носителя, такие как связующие вещества, суспендирующие агенты, дезинтегрирующие агенты, наполняющие агенты, поверхностно-активные вещества, солубилизаторы, стабилизаторы, лубриканты, смачивающие вещества и разбавители.

Материалы, полезные для микроинкапсуляции, описанной здесь, включают материалы, совместимые с соединениями формулы D или второго агента, которые в достаточной степени изолируют соединение формулы D или второго агента от других несовместимых вспомогательных веществ. Материалы, совместимые с соединениями формулы D или второго агента, представляют собой материалы, которые задерживают высвобождение соединений формулы D или второго агента *in vivo*.

Иллюстративные вещества для микроинкапсуляции, подходящие для задержки высвобождения препаратов, включающих описанные здесь соединения, включают, но без ограничения, простые эфиры гидроксипропилцеллюлозы (HPC), такие как Klucel® или Nisso HPC, простые эфиры гидроксипропилцеллюлозы с низкой степенью замещения (L-HPC), простые эфиры гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), такие как Seppifilm-LC, Pharmacoat®, Metolose SR, Methocel®-E, Opadry YS, PrimaFlo, Benecel MP824 и Benecel MP843, полимеры метилцеллюлозы, такие как Methocel®-A, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы Aqoat (HF-LS, HF-LG, HF-MS) и Metolose®, этилцеллюлозы (EC) и их смеси, такие как E461, Ethocel®, Aqualon®-EC, Surelease®, поливиниловый спирт (PVA), такой как Opadry AMB, гидроксизтилцеллюлозы, такие как Natrosol®, карбоксиметилцеллюлозы и соли карбоксиметилцеллюлоз (CMC), такие как Aqualon®-CMC, сополимеры поливинилового спирта и полиэтиленгликоля, такие как Kollicoat IR®, моноглицериды (Myverol), триглицериды (KLX), полиэтиленгликоли, модифицированный пищевой крахмал, акриловые полимеры и смеси акриловых полимеров с простыми эфирами целлюлозы, такие как Eudragit® EPO, Eudragit® L30D-55, Eudragit® FS 30D Eudragit® L100-55, Eudragit® L100, Eudragit® S100, Eudragit® RD100, Eudragit® E100, Eudragit® L12.5, Eudragit® S12.5, Eudragit® NE30D и Eudragit® NE 40D, целлюлозы ацетатфталат, сепифилмы, такие как смеси FIPMC и стеариновой кислоты, циклодекстрины и смеси этих материалов.

В еще других вариантах осуществления пластификаторы, такие как полиэтиленгликоли, например, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 и PEG 800, стеариновая кислота, пропиленгликоль, олеиновая кислота и триацетин, включены в материал для микроинкапсуляции. В других вариантах осуществления материал для микроинкапсуляции, эффективный для задержки высвобождения фармацевтических композиций, описан в USP или National Formulary (NF). В еще других вариантах осуществления материал для микроинкапсуляции представляет собой Klucel. В еще других вариантах осуществления материал для микроинкапсуляции представляет собой метоцел.

Микроинкапсулированные соединения формулы D или второго агента могут быть формулированы способами, известными специалистам в данной области. Такие известные способы включают, например, сушку распылением, процессы растворения с вращающимся диском, плавление при высоких температурах, охлаждение с распылением, ожижение слоя, электростатическое осаждение, центрифугальную экстракцию, ротационное разделение суспензий, полимеризацию на поверхности раздела жидкость-газ или твердое тело-газ, экструзию под давлением или экстракцию растворителя с распылением. Дополнительно к перечисленным методам также можно применять некоторые химические методы, например, комплексную коацервацию, выпаривание растворителя, межполимерную несовместимость, межфазную полимеризацию в жидкой среде, полимеризацию *in situ*, сушку в жидкой фазе и десольватацию в жидкой среде. Кроме того, также можно применять другие методы, такие как роликовое уплотнение, экструзия/сферонизация, коацервация или покрытие покрытия из наночастиц.

В одном варианте осуществления частицы соединений формулы D или второго агента микроинкапсулируют перед формулированием в одну из указанных выше форм. В еще другом варианте осуществления некоторые или большинство частиц заключают в оболочку перед формулированием с использованием стандартных методов нанесения покрытий, например таких, которые описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition (2000).

В других вариантах осуществления твердые лекарственные формы соединений формулы D или второго агента пластифицированы (покрыты) одним или более слоями. Для примера, пластификатор, как правило, представляет собой твердое вещество или жидкость с высокой температурой кипения. Пригодные пластификаторы могут быть добавлены в количестве примерно от 0.01 до примерно 50% по массе (масса/масса) композиции покрытия. Пластификаторы включают, но без ограничения, диэтилфталат, сложные эфиры лимонной кислоты, полиэтиленгликоль, глицерин, ацетилированные глицериды, триацетин, полипропиленгликоль, триэтилцитрат, дибутилсебакат, стеариновую кислоту, стеарол, стеарат и касторовое масло.

В других вариантах осуществления порошок, включая лекарственные формы с соединением формулы D или вторым агентом, описанным здесь, может быть формулирован с включением одного или более фармацевтических вспомогательных веществ и вкусовых агентов. Такие порошки могут быть приготовлены, например, путем перемешивания композиции и необязательных фармацевтических вспомогательных веществ с получением объемной смеси композиции. Дополнительные варианты осуществления

также включают суспендирующий агент и/или смачивающий агент. Эта объемная смесь равномерно разделена на упаковки с единичными дозами или упаковки, содержащие множество доз.

В еще других вариантах осуществления шипучие порошки также приготовлены согласно настоящему изобретению. Шипучие соли использовали для диспергирования лекарственных средств в воде для перорального введения. Шипучие соли представляют собой гранулы или крупные порошки, содержащие лекарственное средство в сухой смеси, обычно состоящей из бикарбоната натрия, лимонной кислоты и/или винной кислоты. При добавлении солей композиций, описанных здесь, к воде кислоты и основание реагируют с высвобождением углекислого газа, вызывая тем самым "шипение". Примеры шипучих солей включают, например, следующие ингредиенты: бикарбонат натрия или смесь бикарбоната натрия и карбоната натрия, лимонную кислоту и/или винную кислоту. Любая комбинация кислота-основание, которая вызывает высвобождение углекислого газа, может быть использована вместо комбинации бикарбоната натрия и лимонной и винной кислоты, при условии, что ингредиенты пригодными для фармацевтического применения и обеспечивают pH около 6.0 или выше.

В некоторых вариантах осуществления твердые лекарственные формы, описанные здесь, могут быть формулированы в виде пероральных лекарственных форм с энтеросолюбильным покрытием с отсроченным высвобождением, то есть в виде периральной лекарственной формы фармацевтической композиции, описанной здесь, которая использует энтеросолюбильное покрытие для достижения высвобождения в тонком кишечнике желудочно-кишечного тракта. Лекарственные формы с энтеросолюбильным покрытием могут представлять собой прессованную или формованную, или экструдированную таблетку/форму (покрытую или непокрытую), содержащую гранулы, порошок, пеллеты, шарики или частицы активного ингредиента и/или другие компоненты композиции, которые сами по себе являются покрытыми или непокрытыми. Лекарственная форма с энтеросолюбильным покрытием может также представлять собой капсулу (покрытую или непокрытую), содержащую пеллеты, шарики или гранулы твердого носителя или композиции, которые сами по себе являются покрытыми или непокрытыми.

Термин "отсроченное высвобождение", использованный в данном контексте, относится к такой доставке, при которой высвобождение может осуществляться в какой-либо, в целом, предсказуемой области кишечного тракта, более дистальной по отношению к области, в которой бы осуществлялось высвобождение при отсутствии изменений, вызванных отсроченным высвобождением. В некоторых вариантах осуществления способом отсрочки высвобождения является покрытие. Любые покрытия должны иметь достаточную толщину таким образом, чтобы оболочка в целом не растворялась в желудочно-кишечном соке при pH ниже около 5, но при этом растворялась при pH около 5 или выше. Как ожидается, любые анионные полимеры, характеризующиеся pH-зависимым профилем растворимости, можно применять в качестве энтеросолюбильного покрытия в способах и композициях, описанных здесь, для достижения доставки в нижний отдел желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления полимеры, описанные здесь, представляют собой анионные карбоксильные полимеры. В других вариантах осуществления полимеры и их совместимые смеси, и некоторые их свойства включают, но без ограничения

Шеллак, также называемый как очищенный сырой шеллак, очищенный продукт, полученный из смолистого секрета насекомого. Это покрытие растворяется в среде, имеющей pH > 7;

Акриловые полимеры

Характеристики акриловых полимеров (главным образом, их растворимость в биологических жидкостях) могут изменяться в зависимости от степени и типа замещения. Примеры пригодных акриловых полимеров включают сополимеры метакриловой кислоты и сополимеры метакрилата аммония. Серии эудрагит (Eudragit) E, L, R, S, RL, RS и NE (Rohm Pharma) доступны как солюбилизированные в органическом растворителе, водной дисперсии или сухих порошках. Серии Eudragit RL, NE и RS нерастворимы в желудочно-кишечном тракте, но являются проницаемыми и используются главным образом для доставки в толстую кишку. Серии Eudragit E растворяются в желудке. Серии Eudragit L, L-30D и S нерастворимы в желудке и растворяются в кишечнике;

Производные целлюлозы

Примерами пригодных производных целлюлозы являются этилцеллюлоза; реакционные смеси неполных ацетатных эфиров целлюлозы с фталевым ангидридом. Свойства могут изменяться в зависимости от степени и типа замещения. Ацетат-фталат целлюлозы (CAP) растворяется при pH > 6. Aquateric (FMC) является водной системой и представляет собой высушенный распылением CAP-псевдолатекс с частицами <1 мкм. Другие компоненты в Aquateric могут включать плуроники (pluronic), разновидности Tween и ацелированные моноглицериды. Другие пригодные производные целлюлозы включают ацетат-тримеллитат целлюлозы (Eastman); метилцеллюлозу (Pharmacoat, Methocel); фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP); сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCS); и ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (напр., AQOAT (Shin Etsu)). Свойства могут изменяться в зависимости от степени и типа замещения. Например, HPMCP таких марок, как HP-50, HP-55, HP-55S, HP-55F является пригодным. Свойства могут изменяться в зависимости от степени и типа замещения. Например, пригодные марки ацетата сукцината гидроксипропилметилцеллюлозы включают, но без ограничения, AS-LG (LF), который растворяется при pH 5, AS-MG (MF), который растворяется при pH 5.5, и AS-HG (HF),

который растворяется при более высоком pH. Эти полимеры предлагаются в виде гранул или тонкоизмельченных порошков для водных дисперсий; фталат поливинилацетата (PVAP). PVAP растворяется при $\text{pH} > 5$ и является значительно менее проницаемым для водяного пара и желудочного сока.

В некоторых вариантах осуществления покрытие может содержать и, как правило, содержит пластификатор, и возможно другие вспомогательные вещества покрытия, такие как красители, тальк и/или стеарат магния, которые хорошо известны в данной области. Пригодные пластификаторы включают триэтилцитрат (Citroflex 2), триацетин (глицеринтриацетат), ацетилтриэтилцитрат (Citroflex A2), Carbowax 400 (полиэтиленгликоль 400), диэтилфталат, трибутилцитрат, ацетилованные моноглицериды, глицерин, сложные эфиры жирных кислот, пропиленгликоль и дибутилфталат. В частности, анионные карбоксилсодержащие акриловые полимеры обычно содержат 10-25 мас.% пластификатора, в частности дибутилфталат, полиэтиленгликоль, триэтилцитрат и триацетин. Для нанесения покрытий используют обычные методы нанесения покрытия, такие как покрытие распылением или нанесение оболочки. Толщина покрытия должна быть достаточной для гарантии того, что пероральная лекарственная форма остается интактной до достижения желаемой области местной доставки в кишечнике.

Помимо пластификаторов в покрытия могут быть добавлены красители, средства для устранения клейкости, поверхностно-активные вещества, противоспецификающие агенты, лубриканты (напр., карнаубский воск или PEG) для солюбилизации или диспергирования материала покрытия, а также для улучшения свойств покрытия и покрытого продукта.

В других вариантах осуществления лекарственные формы, описанные здесь, которые включают соединения формулы D или второго агента, доставляют с использованием лекарственной формы с импульсным высвобождением. Лекарственная форма с импульсным высвобождением может обеспечить один или более импульсов немедленного высвобождения в заданные моменты времени после контролируемого времени задержки или в определенных местах. Много других типов систем с контролируемым высвобождением известно специалистам в данной области и являются пригодными для использования с композициями, описанными здесь.

Примеры таких систем доставки включают, например, системы на основе полимеров, таких как полимолочная кислота и полигликолевая кислота, полиангидриды и поликапролактон; пористые матрицы, системы на основе неполимеров, которые представляют собой липиды, включая стеролы, такие как холестерил, сложные эфиры холестерина и жирные кислоты, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; гидрогелевые системы высвобождения; силастиковые системы; системы на основе пети-дов; восковые покрытия, биоэродируемые лекарственные формы, прессованные таблетки с использованием обычных связывающих веществ и т.п. См., например, Liberman et al., *Pharmaceutical Dosage Forms*, 2nd Ed., vol. 1, pp. 209-214 (1990); Singh et al., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2nd Ed., pp. 751-753 (2002); U.S. Pat. Nos. 4327725, 4624848, 4968509, 5461140, 5456923, 5516527, 5622721, 5686105, 5700410, 5977175, 6465014 и 6932983, каждый из которых включен путем отсылки.

В некоторых вариантах осуществления обеспечены фармацевтические лекарственные формы, которые включают частицы соединений формулы D или второго агента, описанных здесь, и по меньшей мере один диспергирующий агент или суспендирующий агент для перорального введения субъекту. Лекарственные формы могут представлять собой порошок и/или гранулы для суспензии и при смешивании с водой получают, по существу, однородную суспензию.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут представлять собой водные суспензии, выбранные из группы, включающей, но без ограничения, фармацевтически приемлемые водные пероральные дисперсии, эмульсии, растворы, элексиры, гели и сиропы. См., например, Singh et al., *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 2nd Ed., pp. 754-757 (2002). Дополнительно к частицам соединений формул (A1-A6), жидкие лекарственные формы могут включать добавки, такие как: (a) дезинтегрирующие агенты; (b) диспергирующие агенты; (c) смачивающие агенты; (d) по меньшей мере один консервант; (e) повышающие вязкость агенты; (f) по меньшей мере один подсластитель и (g) по меньшей мере одну вкусовую добавку. В некоторых вариантах осуществления водные дисперсии могут дополнительно включать кристаллический ингибитор.

Водные суспензии и дисперсии, описанные здесь, могут оставаться в гомогенном состоянии, как определено в USP Pharmacists' Pharmacopoeia (2005 edition, chapter 905) в течение по меньшей мере 4 ч. Гомогенность должна определяться с помощью метода отбора проб, согласующегося в отношении определения гомогенности всей композиции. В одном варианте осуществления водная суспензия может быть ресуспендирована в гомогенную суспензию путем физического осаждения, продолжающегося менее 1 мин. В другом варианте осуществления водная суспензия может быть ресуспендирована в гомогенную суспензию путем физического осаждения в течение менее чем 45 с. В еще другом варианте осуществления водная суспензия может быть ресуспендирована в гомогенную суспензию путем физического осаждения в течение менее чем 30 с. В еще другом варианте осуществления осаждение не требуется для поддержания гомогенной водной дисперсии.

Примеры дезинтегрирующих агентов для использования в водных суспензиях и дисперсиях включают, но без ограничения, кархмал, например природный крахмал, такой как кукурузный крахмал или

картофельный крахмал, прежелатинизированный крахмал, такой как National 1551 или Amijel®, или гликоляткарахмал натрия, такой как Promogel® или Explotab®, целлюлозу, такую как древесный продукт, метилкристаллическая целлюлоза, например, Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel® PH105, Elcema® P100, Emcocoel®, Vivacel®, Ming Tia® и Solka-Floc®, метилцеллюлоза, кроскармеллоза или поперечно-сшитая целлюлоза, такая как поперечно-сшитая натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Ac-Di-Sol®), поперечно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза или поперечно-сшитая кроскармеллоза, поперечно-сшитый крахмал, такой как гликоляткарахмал натрия, поперечно-сшитый полимер, такой как кросповидон, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, альгинат, такой как альгиновая кислота или соль альгиновой кислоты, такая как альгинат натрия, глину, такую как Veegum® HV (алюмосиликат магния), камедь, такую как агар, гуаровую камедь, камедь плодов рожкового дерева, камедь карайи, пектин или трагантовую камедь, гликоляткарахмал натрия, бентонит, природную губку, поверхностно-активное вещество, смолу, такую как катионообменная смола, цитрусовую пульпу, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия в комбинации с крахмалом и т.п.

В некоторых вариантах осуществления диспергирующие агенты, пригодные для водных суспензий и дисперсий, описанных здесь, известны в данной области и включают, например, гидрофильные полимеры, электролиты, Tween® 60 или 80, PEG, поливинилпирролидон (PVP; коммерчески известный как Plasdone®), и диспергирующие агенты на основе углеводов, такие как, например, гидроксипропилцеллюлоза и простые эфиры гидроксипропилцеллюлозы (например, HPC, HPC-SL и HPC-L), гидроксипропилметилцеллюлоза и простые эфиры гидроксипропилметилцеллюлозы (например, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M HPMC K100M), натрий-карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксизтилцеллюлоза, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы, некристаллическая целлюлоза, алюмосиликат магния, триэтаноламин, поливиниловый спирт (PVA), сополимеры поливинилпирролидона и винилацетата (Plasdone®, например, S-630), 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенольный полимер с этиленоксидом и формальдегидом (также известный как тилоксапол), полоксамеры (например, Pluronic F68®, F88® и F108®, которые являются блок-сополимерами этиленоксида и пропиленоксида); и полоксамины (например, Tetronic 908®, также известный как Poloxamine 908®, который является тетрафункциональным блок-сополимером, полученным в результате последовательного добавления пропиленоксида и этиленоксида в этилендиамин (BASF Corporation, Parsippany, N.J.)). В других вариантах осуществления диспергирующий агент выбран из группы, не содержащей один из следующих агентов: гидрофильные полимеры; электролиты; Tween® 60 или 80; PEG; поливинилпирролидон (PVP); гидроксипропилцеллюлоза и простые эфиры гидроксипропилцеллюлозы (например, FIPC, FIPC-SL и FIPC-L); гидроксипропилметилцеллюлоза и простые эфиры гидроксипропилметилцеллюлозы (например, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M, HPMC K100M и Pharmacoat® USP 2910 (Shin-Etsu)); натрий-карбоксиметилцеллюлоза; метилцеллюлоза; гидроксизтилцеллюлоза; фталат гидроксипропилметилцеллюлозы; ацетат-стеарат гидроксипропилметилцеллюлозы; некристаллическая целлюлоза; алюмосиликат магния; триэтаноламин; поливиниловый спирт (PVA); 4-(1,1,3,3-триметилбутил)-фенольный полимер с этиленоксидом и формальдегидом; полоксамеры (например, Pluronic F68®, F88® и F108®, которые представляют собой блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида); или полоксамины (например, Tetronic 908®, также называемый как Poloxamine 908®).

Смачивающие агенты, пригодные для водных суспензий и дисперсий, описанных здесь, известны в данной области и включают, но без ограничения, цетиловый спирт, глицеролмоноостеарат, сложные эфиры полиоксизтилен сорбитана и жирной кислоты (например, коммерчески доступные Tweens®, такие как, например, Tween 20® и Tween 80® (ICI Specialty Chemicals)) и полиэтиленгликоли (например, Carbowax 3350® и 1450®, и Carbopol 934® (Union Carbide)), олеиновую кислоту, глицерил моноостеарат, сорбитан моноолеат, сорбитан монолаурат, триэтаноламин олеат, полиоксизтилен сорбитан моноолеат, полиоксизтилен сорбитан монолаурат, натрий олеат, лаурилсульфат натрия, докузат натрия, триацетин, витамин E TPGS, таурохолат натрия, симетикон, фосфотидилхолин и т.п.

Пригодные консерванты для водных суспензий или дисперсий, описанных здесь, включают, например, сорбат калия, парабыны (например, метилпарабен и пропилпарабен), бензойную кислоту и ее соли, другие эфиры парагидроксибензойной кислоты, такие как бутилпарабен, спирты, такие как этиловый спирт или бензиловый спирт, фенольные соединения, такие как фенол, или четвертичные соединения, такие как бензалкония хлорид. Консерванты, используемые здесь, включены в лекарственную форму в концентрации, достаточной для ингибирования микробного роста.

Пригодные агенты, увеличивающие вязкость, для водных суспензий или дисперсий, описанных здесь, включают, но без ограничения, метилцеллюлозу, ксантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, Plasdon® S-630, карбомер, поливиниловый спирт, альгинаты, аравийскую камедь, хитозаны и их комбинации. Концентрация увеличивающих вязкость агентов будет зависеть от выбранного агента и требуемой вязкости.

Примеры подсластителей, пригодных для водных суспензий или дисперсий, описанных здесь, включают, например, сироп акации, ацесульфам калия, алитам, анис, яблоко, аспартам, банан, баварские

сливки, ягоды, черную смородину, ириски, цитрат кальция, камфору, карамель, вишню, вишню со сливками, шоколад, корицу, жевательную резинку, цитрус, цитрусовый пунш, цитрусовые сливки, сахарную вату, какао, колу, свежую вишню, свежий цитрус, цикламат, циламат, декстрозу, эвкалипт, эвгенол, фруктозу, фруктовый пунш, имбирь, глицирретинат, сироп солодки (лакрица), виноград, грейпфрут, мед, изомальт, лимон, лайм, лимон со сливками, моноаммоний глицирризинат (MagnaSweet®), мальтол, маннит, клен, алтей, ментол, мяту со сливками, смесь ягод, неогесперидин DC, неотам, апельсин, грушу, персик, перечную мяту, перечную мяту со сливками, порошок Prosweet®, малину, рутбир, ром, сахарин, сафрол, сорбит, зеленую мяту, зеленую мяту со сливками, землянику, землянику со сливками, стевию, сукралозу, сахарозу, сахарин натрия, сахарин, аспартам, ацесульфам калия, маннит, талин, сукралозу, сорбит, швейцарские сливки, тагатозу, мандарин, тауматин, тутти-фрутти, ваниль, грецкий орех, арбуз, дикую вишню, гаультерию, ксилитол или любую комбинацию таких ароматизаторов, например, анис-ментол, вишня-анис, корица-апельсин, вишня-корица, шоколад-мята, мед-лимон, лимон-лайм, лимон-мята, ментол-эвкалипт, апельсин-сливки, ваниль-мята, и их смеси. В одном варианте осуществления водная жидкая дисперсия может содержать подсластитель или вкусовую добавку в концентрации, изменяющейся от примерно 0.001 до примерно 1.0 об.% водной дисперсии. В другом варианте осуществления водная жидкая дисперсия может содержать подсластитель или вкусовую добавку в концентрации, изменяющейся от примерно 0.005 до примерно 0.5 об.% водной дисперсии. В еще другом варианте осуществления водная жидкая дисперсия может содержать подсластитель или вкусовую добавку в концентрации, изменяющейся от примерно 0.01 до примерно 1.0 об.% водной дисперсии.

Дополнительно к добавкам, перечисленным выше, жидкие лекарственные формы могут также включать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как вода и другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы. Иллюстративными эмульгаторами являются этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, лаурилсульфат натрия, доккузат натрия, холестерин, сложные эфиры холестерина, таурохолевая кислота, фосфотидилхолин, масла, такие как хлопковое масло, масло арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло, глицерол, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоль, сложные эфиры жирных кислот сорбитана или смеси этих веществ и т.п.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные здесь, могут представлять собой самоэмульгирующиеся системы доставки лекарственного средства (SEDDS). Эмульсии представляют собой дисперсии одной несмешиваемой фазы в другой, как правило, в форме капель. В целом, эмульсии образуются при интенсивном механическом перемешивании. SEDDS, в отличие от эмульсий или микроэмульсий, спонтанно образуются при добавлении в избыточное количество воды без какого-либо внешнего механического диспергирования или перемешивания. Преимущество SEDDS заключается в том, что для распределения капель в растворе необходимо лишь незначительное перемешивание. Кроме того, вода или водная фаза может быть добавлена непосредственно перед введением, что обеспечивает стабильность неустойчивого или гидрофобного активного ингредиента. Таким образом, SEDDS обеспечивает эффективную систему доставки при пероральном или парентеральном введении гидрофобных активных ингредиентов. SEDDS могут улучшить биодоступность гидрофобных активных ингредиентов. Способы получения самоэмульгирующихся лекарственных форм известны в данной области и включают, но без ограничения, например патенты США №№ 5858401, 6667048 и 6960563, каждый из которых специально включен здесь путем отсылки.

Следует отметить, перечисленные выше добавки, используемые в водных дисперсиях или суспензиях, описанных здесь, частично совпадают, так как данные добавки часто классифицируются по-разному различными пользователями или обычно используются для различных целей. Так, перечисленные выше добавки следует рассматривать только в качестве примеров, но не ограничения типов добавок, которые могут быть включены в описанные здесь композиции. Количество таких добавок может быть без труда определено специалистом в данной области в зависимости от желаемых свойств.

Лекарственные формы для интраназального введения

Лекарственные формы для интраназального введения известны в данной области и описаны, например, в патентах США №№ 4476116, 5116817 и 6391452, каждый из которых специально включен путем отсылки. Лекарственные формы, которые включают соединение по любой из формулы (A1-A6), формулы (B1-B6), формулы (C1-C6) или формулы (D1-D6), которые изготовлены в соответствии с этими и другими способами, хорошо известными в данной области, получены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других пригодных консервантов, фторуглеродов и/или других солюбилизующих или диспергирующих агентов, известных в данной области. См., например, Ansel, H. C. et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Sixth Ed. (1995). Предпочтительно эти композиции и лекарственные формы приготовлены с пригодными нетоксичными фармацевтически приемлемыми ингредиентами. Эти ингредиенты известны специалистам, имеющим опыт в приготовлении назальных лекарственных форм, и некоторые из них можно найти в REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21st edition, 2005, стандартная ссылка в

данной области. Выбор пригодных носителей сильно зависит от природы требуемой назальной лекарственной формы, например, растворов, суспензий, мазей или гелей. Назальные лекарственные формы, как правило, содержат большие количества воды дополнительно к активному ингредиенту. Также могут присутствовать незначительные количества других ингредиентов, таких как регуляторы pH, эмульгаторы или диспергирующие агенты, консерванты, поверхностно-активные вещества, гелеобразующие агенты или буферные и другие стабилизирующие и солубилизирующие агенты. Назальная лекарственная форма должна быть изотоничной по отношению к назальным выделениям.

Для введения путем ингаляции соединения формулы D или второго агента, описанные здесь, могут быть представлены в форме аэрозоля, тумана или порошка. Фармацевтические композиции, описанные здесь, обычно доставляют в форме распыляемого аэрозоля из вакуумированных упаковок или небулайзера, с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого пригодного газа. В случае находящегося под давлением аэрозоля единица дозирования может быть определена путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи, изготовленные в качестве примера только из желатина, для использования в ингаляторе или инсуффляторе, могут содержать порошковую смесь соединения, описанного здесь, и пригодную порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Лекарственные формы для буккального введения

Лекарственные формы для буккального введения, которые включают соединения формулы D или второго агента, могут быть введены с использованием различных лекарственных форм, известных в данной области. Например, такие лекарственные формы включают, но без ограничения, описанные в патентах США №№ 4229447, 4596795, 4755386 и 5739136, каждый из которых специально включен здесь путем отсылки. Кроме того, буккальные лекарственные формы, описанные здесь, могут дополнительно включать биоразлагаемый (гидролизуемый) полимерный носитель, который также служит для прилипания лекарственной формы к слизистой оболочке щеки. Буккальные лекарственные формы изготовлены таким образом, чтобы постепенно разлагаться в течение заданного периода времени, в течение которого, по существу, обеспечивается доставка соединения любой формулы D или второго агента. Буккальная доставка лекарственного средства, как будет очевидно специалистам в данной области, позволяет избежать недостатков, присущих пероральному введению лекарственного средства, например, медленной абсорбции, разложения активного агента жидкостями, присутствующими в желудочно-кишечном тракте и/или инактивации в печени при первом проходе. В отношении биоразлагаемого (гидролизуемого) полимерного носителя, очевидно, что может быть использован любой такой носитель, если только он не препятствует желаемому характеру высвобождения лекарственного средства и если такой носитель совместим с соединением формулы D или второго агента, и любыми другими компонентами, которые могут присутствовать в буккальной дозированной единице. Как правило, полимерный носитель содержит гидрофильные (водорастворимые и водонабухаемые) полимеры, которые прилипают к влажной поверхности слизистой оболочки щеки. Примеры полимерных носителей, подходящих для применения здесь, включают полимеры акриловой кислоты и другие полимеры, например, соединения, известные как "карборолы" (Carbopol® от B.F. Goodrich является одним из таких полимеров). Другие компоненты, которые могут быть также включены в буккальные лекарственные формы, описанные здесь, включают, но без ограничения, дезинтегрирующие агенты, разбавители, связующие вещества, лубриканты, вкусовые добавки, красители, консерванты и т.п. Для буккального или сублингвального введения композиции могут быть представлены в виде таблеток, пастилок или гелей, изготовленных обычным способом.

Лекарственные формы для трансдермального введения

Лекарственные формы для трансдермального введения, описанные здесь, можно вводить с использованием различных устройств, описанных в данной области. Например, такие устройства включают, но без ограничения, патенты США №№ 3598122, 3598123, 3710795, 3731683, 3742951, 3814097, 3921636, 3972995, 3993072, 3993073, 3996934, 4031894, 4060084, 4069307, 4077407, 4201211, 4230105, 4292299, 4292303, 5336168, 5665378, 5837280, 5869090, 6923983, 6929801 и 6946144, каждый из которых специально включен здесь путем отсылки в полном объеме.

Лекарственные формы для трансдермального введения, описанные здесь, могут включать конкретные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые обычно используются в данной области. В одном варианте осуществления трансдермальные лекарственные формы, описанные здесь, включают по меньшей мере три компонента: (1) композицию на основе соединения формулы D или второго агента; (2) усилители проникновения и (3) вспомогательный агент на водной основе. Кроме того, лекарственные формы для трансдермального введения могут включать дополнительные компоненты, такие как, но без ограничения, желирующие агенты, основы для кремов и мазей и т.п. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для трансдермального введения дополнительно включает подложку из тканого или нетканого материала для повышения абсорбции и предотвращения удаления трансдермального препарата с кожи. В других вариантах осуществления лекарственные формы для трансдермального введения, описанные здесь, могут находиться в насыщенном или перенасыщенном состоянии для улучшения диффузии через кожу.

Лекарственные формы, пригодные для трансдермального введения соединений, описанных здесь,

могут использовать устройства трансдермальной доставки и пластыри трансдермальной доставки, и могут представлять собой липофильные эмульсии или буферные водные растворы, растворенные и/или диспергированные в полимере или связующем веществе. Такие пластыри могут быть сконструированы для непрерывной, импульсной доставки или доставки фармацевтических агентов в тот момент, когда это необходимо. Кроме того, трансдермальная доставка соединений, описанных здесь, может быть осуществлена посредством ионтофоретических пластырей и т.п. Кроме того, пластыри для трансдермального введения могут обеспечивать контролируемую доставку соединений формулы D или второго агента. Скорость абсорбции может быть снижена с помощью мембран, контролирующей скорость абсорбции, или путем заключения соединения в полимерную матрицу или гель. И наоборот, для увеличения абсорбции могут быть использованы средства для усиления поглощения. Усилитель абсорбции или носитель может включать абсорбируемые фармацевтически приемлемые растворители для способствования прохождению через кожу. Например, устройства для трансдермального введения представлены в виде бандаж, содержащего материал основы, резервуар, содержащий соединение, необязательно с носителями, необязательно с контролирующим скорость барьером для доставки соединения через кожу хозяина с контролируемой и предварительно установленной скоростью в течение продолжительного периода времени, и средства для закрепления устройства на коже.

Лекарственные формы для инъекций

Лекарственные формы, которые включают соединение формулы D или второго агента, пригодные для внутримышечной, подкожной или внутривенной инъекции, могут включать физиологически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии и стерильные порошки для восстановления в стерильных растворах или дисперсиях для инъекций. Примеры пригодных водных или неводных носителей, разбавителей, растворителей или наполнителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, кремофор и т.п.), их пригодные смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Необходимая текучесть может поддерживаться, например, путем использования оболочки, такой как лецитиновая оболочка, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, и путем использования поверхностно-активных веществ. Лекарственные формы, пригодные для подкожной инъекции, могут также содержать добавки, такие как консерванты, увлажнители, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение роста микроорганизмов может быть обеспечено за счет использования различных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Может быть желательным включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Пролонгированное поглощение инъецируемой фармацевтической формы может быть достигнуто путем использования агентов, задерживающих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Для внутривенных инъекций соединения, описанные здесь, могут быть сформулированы в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, такие как раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический солевой раствор. Для трансмукозального введения в лекарственной форме используются вещества, способствующие проникновению, соответствующие барьеру, через который должно осуществляться проникновение. Такие пенетранты в целом известны в данной области. Для других парентеральных инъекций соответствующие лекарственные формы могут включать водные или неводные растворы, предпочтительно с физиологически совместимыми буферами или вспомогательными веществами. Такие вспомогательные вещества в целом известны в данной области.

Парентеральные инъекции могут включать болюсную инъекцию или непрерывное вливание. Лекарственные формы для инъекции могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в контейнерах, содержащих множество доз, с добавленным консервантом. Фармацевтическая композиция, описанная здесь, может быть представлена в форме, пригодной для парентеральной инъекции в виде стерильных суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных наполнителях, и может содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Фармацевтические лекарственные формы для парентерального введения включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть приготовлены в виде соответствующих масляных суспензий для инъекции. Пригодные липофильные растворители или наполнители включают нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или сложные эфиры синтетических нелетучих кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекции могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно суспензия может также содержать пригодные стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость соединений для обеспечения проникновения высококонцентрированных растворов. Альтернативно, активный ингредиент может быть представлен в порошковой форме для восстановления пригодным наполнителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед использованием. Другие лекарственные формы

В определенных вариантах осуществления могут быть использованы системы доставки фармацевтических соединений, такие как, например, липосомы и эмульсии. В определенных вариантах осуществ-

ления композиции, обеспеченные здесь, могут также включать мукоадгезивный полимер, выбранный, например, из карбоксиметилцеллюлозы, карбомера (полимера акриловой кислоты), поли(метилметакрилата), полиакриламида, поликарбофила, сополимера акриловой кислоты и бутилакрилата, альгината натрия и декстрана.

В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные здесь, могут быть введены местно и могут быть сформулированы в различные вводимые местно композиции, такие как растворы, суспензии, лосьоны, гели, пасты, карандаши, тампоны, кремы или мази. Такие фармацевтические соединения могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, повышающие тоничность агенты, буферы и консерванты.

Соединения, описанные здесь, могут быть также сформулированы в композиции для ректального введения, такие как клизмы, ректальные гели, ректальные пены, ректальные аэрозоли, суппозитории, гелевые суппозитории или удерживающие клизмы, содержащие обычные основы суппозитория, такие как масло какао или другие глицериды, а также синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидон, PEG и т.п. В композициях в виде суппозитория в первую очередь происходит плавление легкоплавкого воска, такой как, но без ограничения, смесь глицеридов жирных кислот, необязательно в комбинации с маслом какао.

Дозирование и терапии

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающие: (a) проведение у субъекта первой терапии, содержащей количество необратимого ингибитора Btk, достаточное для мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли; и (b) анализ мобилизованного множества клеток. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk является достаточным для индукции лимфоцитоза множества клеток из злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 300 до 1000 мг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 420 до 840 мг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 420 мг/сутки, примерно 560 мг/сутки или примерно 840 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 420 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления AUC_{0-24} ингибитора Btk составляет между примерно 150 и примерно 3500 нг·ч/мл. В некоторых вариантах осуществления AUC_{0-24} ингибитора Btk составляет между примерно 500 и примерно 1100 нг·ч/мл. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk вводят один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk вводят до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk вводят ежедневно до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk вводят через день до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk представляет собой поддерживающую терапию.

Соединения, описанные здесь, могут быть использованы для приготовления лекарственных препаратов для ингибирования Btk или его гомолога, или для лечения заболеваний или состояний, которые будут иметь положительный эффект в результате ингибирования Btk или его гомолога, включая пациента и/или субъекта, у которого диагностирована гематологическая злокачественная опухоль. Кроме того, способ лечения любого из заболеваний или состояний, описанных здесь, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, включает введение фармацевтических композиций, содержащих, по меньшей мере, одно соединение по любой из формулы (A), формулы (B), формулы (C) или формулы (D), описанных здесь, или его фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый N-оксид, фармацевтически активный метаболит, фармацевтически приемлемое пролекарство или фармацевтически приемлемый сольват в терапевтически эффективных количествах указанному субъекту.

Композиции, содержащие соединение(я), описанное здесь, может быть введено для профилактического, терапевтического или поддерживающего лечения. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие соединения, описанные здесь, вводят для терапевтических целей (например, вводят пациенту, у которого диагностирована гематологическая злокачественная опухоль). В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие соединения, описанные здесь, вводят в терапевтических целях (например, вводят пациенту, подверженному или иным образом имеющему риск развития гематологической злокачественной опухоли). В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие соединения, описанные здесь, вводят пациенту, который находится в стадии ремиссии, в качестве поддерживающей терапии.

Количества соединения, раскрытого здесь, будут зависеть от применения (например, терапевтического, профилактического или поддерживающего). Количества соединения, раскрытого здесь, будут зависеть от степени тяжести и течения заболевания или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья пациента, массы тела и ответа на лекарственные средства, а также заключения лечащего тера-

пента. В компетенции специалиста в данной области находится определение таких терапевтически эффективных количеств с помощью простых экспериментов (включая, но без ограничения, клинические исследования увеличения дозы). В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 300 до 1000 мг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 420 до 840 мг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 400 и 860 мг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 360 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 420 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 560 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 840 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 2 до 13 мг/кг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 2.5 до 8 мг/кг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 2.5 до 6 мг/кг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет от 2.5 до 4 мг/кг/сутки включительно. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 2.5 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество необратимого ингибитора Btk составляет примерно 8 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят ежедневно. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят через день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят n раз в сутки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят ежедневно до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Btk, раскрытый здесь, вводят через день до прогрессирования заболевания, неприемлемой токсичности или индивидуального выбора.

В случае, когда статус пациента не улучшается, по решению врача введение соединений может быть назначено непрерывным; альтернативно, доза вводимого лекарственного средства может быть временно снижена или временно остановлена на некоторый промежуток времени (то есть "лекарственные каникулы"). Продолжительность лекарственных каникул может колебаться от 2 дней до 1 года, включая, в качестве примера только 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 12 дней, 15 дней, 20 дней, 28 дней, 35 дней, 50 дней, 70 дней, 100 дней, 120 дней, 150 дней, 180 дней, 200 дней, 250 дней, 280 дней, 300 дней, 320 дней, 350 дней или 365 дней. Снижение дозы во время лекарственных каникул может составлять 10-100%, в качестве примера только 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

После наступления улучшения состояния пациента при необходимости вводят поддерживающую дозу. Соответственно, дозирование или частота введения, или и то и другое, могут быть уменьшены как функция симптомов до уровня, при котором поддерживается улучшение заболевания, нарушения или состояния. Тем не менее, пациентам может потребоваться интермиттирующая терапия на длительной основе при любом повторном возникновении симптомов.

Количество заданного агента, которое будет соответствовать такому количеству, будет изменяться в зависимости от факторов, таких как конкретное соединение, степень тяжести заболевания, идентичность (например, масса тела) субъекта или хозяина, нуждающегося в лечении, но может быть легко определено известным в данной области способом в соответствии с конкретными сопровождающими случай обстоятельствами, включая, например, конкретный вводимый агент, способ введения и проходящий лечение субъект или хозяин. В целом, тем не менее, для лечения взрослого человека дозы применяют дозы, которые, как правило, изменяются в диапазоне 0.02-5000 мг в сутки или примерно 1-1500 мг в сутки. Требуемая доза может быть удобным образом представлена в виде однократной дозы или разделенных доз, вводимых одновременно (или в течение короткого промежутка времени) или с соответствующими интервалами в виде двух, трех, четырех или более субдоз в сутки.

Фармацевтические композиции, описанные здесь, могут быть представлены в виде стандартных лекарственных форм, пригодных для однократного введения точных доз. В стандартной лекарственной форме композиция разделена на единичные дозы, содержащие соответствующие количества одного или более соединений. Единичная доза может быть представлена в форме упаковки, содержащей дискретные количества композиции. Неограничивающими примерами являются таблетки или капсулы, а также порошки во флаконах или ампулах. Водные суспензионные композиции могут быть упакованы в одноразовые или не закрываемые повторно контейнеры. Альтернативно, могут быть использованы повторно за-

кываемые контейнеры, содержащие множество доз, и в этом случае, как правило, в композицию включают консервант. В качестве примера только, лекарственные формы для парентеральной инъекции могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, которая включает, но без ограничения, ампулы, или в виде контейнеров, содержащих множество доз с добавлением консерванта. В некоторых вариантах осуществления каждая стандартная лекарственная форма содержит 210 мг соединения, описанного здесь. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 1 стандартную лекарственную форму в сутки. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 2 стандартные лекарственные формы в сутки. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 3 стандартные лекарственные формы в сутки. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят 4 стандартные лекарственные формы в сутки.

Указанные выше диапазоны являются лишь иллюстративными, поскольку существует большое число переменных, касающихся режима лечения субъекта, и часто имеются значительные отклонения от этих рекомендуемых величин. Такие дозы могут быть изменены в зависимости от количества переменных, не ограничивающихся активностью используемого соединения, заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, способом введения, требованиями к индивидуальному субъекту, степени тяжести заболевания или состояния, подлежащего лечению, и заключением практикующего врача.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких терапевтических средств может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или экспериментальных животных, включая, но без ограничения, определение LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсическими и терапевтическими эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражен как отношение между LD₅₀ и ED₅₀. Соединения, проявляющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований животных, могут быть использованы в составлении диапазона доз для применения у человека. Дозы таких соединений предпочтительно лежат в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с минимальной токсичностью. Доза может изменяться в пределах данного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Наборы/готовые изделия

Настоящее изобретение также охватывает наборы для осуществления способов настоящего изобретения. Например, набор может содержать маркированное соединение или агент, способный детектировать биомаркер, описанный здесь, например, биомаркер апоптоза, клеточной пролиферации или выживаемости, или Btk-опосредованный путь передачи сигнала на уровне белка или нуклеиновой кислоты в биологическом образце, и средства определения количества биомаркера в образце (например, антитело или олигонуклеотидный зонд, который связывается с РНК, кодируя представляющий интерес биомаркер) после инкубации образца с представляющим интерес терапевтическим агентом против BCLD. Наборы могут быть упакованы таким образом, чтобы обеспечить детекцию множества представляющих интерес биомаркеров путем включения индивидуально меченых соединений или агентов, способных детектировать каждый индивидуальный представляющий интерес биомаркер, и средств определения количества каждого биомаркера в образце.

Конкретный выбор второго используемого агента будет зависеть от диагноза лечащих врачей и их заключения о состоянии пациента, и соответствующего протокола лечения для ингибиторов Btk.

Примеры

Приведенные ниже частные и неограничивающие примеры следует рассматривать только как иллюстративные и они никоим образом не ограничивают настоящее изобретение. Без более детального пояснения предполагается, что специалист в данной области может применить настоящее изобретение в полном объеме, основываясь на настоящем описании. Все публикации, цитируемые в настоящем документе, включены здесь посредством отсылки в полном объеме. Если ссылка указывает на URL или другой подобный идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в сети Интернет может появляться и исчезать, но при этом равноценная информация может быть найдена путем поиска в Интернете. Ссылка на данную информацию свидетельствует о том, что она доступна и ее можно распространять.

Клинические исследования, представленные здесь ниже, проиллюстрированы с помощью необратимого ингибитора Btk, (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-она (то есть PCI-32765/ибрутиниб). В некоторых вариантах осуществления такие исследования выполнены с использованием ингибитора Btk по любой из формул (A), (A1), (B), (B1), (C), (C1), (D), (D1), (E) или (F). В некоторых вариантах осуществления такие исследования выполнены с использованием ингибитора Btk формулы D.

Пример 1. Клиническое исследование по определению безопасности и эффективности ингибитора Btk PCI-32765

Основными конечными точками исследования PCI-32765 с увеличением дозы, проводимого у человека впервые, были определение профиля нежелательных явлений; определение занятости активного сайта Btk; нахождение максимально переносимой дозы (MTD) (если MTD не достигнута, максимальная доза будет на 3 уровня дозы выше дозы, при которой была достигнута полная занятость Btk); и опреде-

ление фармакокинетики (PK) PCI-32765. Вторичной конечной точкой являлась оценка ответа опухоли на монотерапию PCI-32765.

В исследование с увеличением дозы, которое является частью открытого исследования, включены субъекты с В-клеточными злокачественными опухолями (данные гистологических исследований приведены в табл. 2 ниже), и в настоящее время является завершенным.

Пять уровней доз (всего n=56) тестировали с использованием схемы лечения, состоящей из 28 дней лечения и 7 дней отсутствия лечения; уровни доз составили 1.25 (n=7), 2.5 (n=9), 5.0 (n=6), 8.3 (n=8) и 12.5 (n=7) мг/кг/сутки. Две дополнительные группы пациентов получали непрерывное ежедневное дозирование по 35-дневной схеме: одна группа получала 8.3 мг/кг/сутки (n=10), тогда как другая группа получала 560 мг/сутки ("фиксированная" когорта; n=9). Лечение пациентов с ABC DLBCL проводили в дозе 560 мг/день; отбор пациентов с другими гистологиями был завершен, и данные, полученные у этих пациентов, были опубликованы (Advani et al., 2010).

Семь полных ответов (CR) и 23 частичных ответа (PR) были зафиксированы у всех 56 пациентов; дополнительные 10 субъектов имели стабильное заболевание (SD). Ответы наблюдались при всех уровнях доз и во всех гистологиях. Данные по ответам сведены в табл. 2 (ниже).

Таблица 2. Клинические ответы на PCI-32765

	Пациенты	CR	PR	SD	PD	Не поддаются оценке	ORR (оцениваемые пациенты)	ORR (ITT ^a)
CLL/SLL	16	1	10	3	0	2	79%	69%
FL	16	3	3	3	4	3	46%	38%
MCL	9	3	4	1	1	0	78%	78%
DLBCL	7	0	2	1	4	0	29%	29%
MZL/MALT	4	0	1	1	1	1	33%	25%
WM	4	0	3	1	0	0	75%	75%
Всего	56	7	23	10	10	6	60%	54%

^aНачавшие получать лечение

CR - полный ответ;

PR - частичный ответ;

SD - стабильное течение заболевания;

PD - прогрессирующее течение заболевания;

ORR - частота объективного ответа на терапию;

ITT^a - пациенты, начавшие получать лечение "Intent-to-Treat"

Максимально переносимая доза (MTD) не была достигнута. Зафиксировано две дозолимитирующие токсичности (DLT): один субъект имел длительную нейтропению при уровне дозы 2.5 мг/кг/сутки, и другой субъект имел аллергическую реакцию при уровне дозы 8.3 мг/кг/сутки. Дозолимитирующих токсичностей (DLT) не наблюдалось при конечном уровне дозы (12.5 мг/кг/сутки). Полная занятость Btk наблюдалась у всех пациентов при уровне дозы 2.5 мг/кг/сутки.

Результаты фармакокинетического исследования на День 1 и День 8 (стационарное состояние) представлены в табл. 3 и 4 ниже. Общие концентрации в плазме соединения формулы D (общая=связанная фракция + несвязанная фракция) в целом увеличивались с увеличением нормализованных по массе тела доз, составляющих 1.25, 2.5, 5.0, 8.3 и 12.5 мг/кг на День 1.

Таблица 3. Средние значения (коэффициент вариации) фармакокинетических параметров соединения Формулы D на День 1

Когорта	Кол-во	Доза (мг/кг)	C_{max}^a (нг/мл)	T_{max} (ч)	$AUC_{0-\infty}$ (нг•ч/мл)	$T_{1/2}^b$ (ч)
1	5 ^c	1.25	48.7 (54%)	1.0 (0%)	181 (50%)	1.7 (27%)
2	9	2.5	90.4 (92%)	2.1 (60%)	494 (83%)	1.5 (33%)
3	6	5	86.1 (136%)	2.3 (59%)	419 (95%)	2.5 (51%)
4	8	8.3	135 (71%)	1.8 (59%)	923 (84%)	2.1 (28%)
CD	10	8.3	155 (81%)	2.2 (49%)	1027 (77%)	2.1 (35%)
5	7	12.5	383 (72%)	1.7 (28%)	1550 (57%)	1.5 (27%)
Фикс.	9	560 мг фиксированная доза	156 (91%)	1.8 (55%)	749 (69%)	2.65 (69%)

AUC = площадь под кривой;

CD = непрерывное дозирование;

C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства;

$t_{1/2}$ = период полувыведения;

T_{max} = время до достижения максимальной концентрации

a - нижний предел количественного определения составил 0.050 нг/мл для PCI-32765

b - период полувыведения от T_{max} до 6 ч после дозирования с 2 из 7 субъектов имели резко отклоняющиеся значения

Таблица 4. Средние значения (коэффициент вариации) фармакокинетических параметров PCI-32765 в стационарном состоянии (День 8) (Исследование PCYC-04753)

Когорта	Кол-во	Доза (мг/кг)	C_{max}^a (нг/мл)	$C_{max}/доза$ (г/л)	AUC_{0-24h} (нг•ч/мл)	$AUC_{0-24h}/доза$ (г•ч/мл)
1	5	1.25	27.0 (56%) ^b	22.3 (49%)	301 (61%)	250 (53%)
2	9	2.5	114 (93%)	37.2 (108%)	1840 (122%)	408 (114%)
3	6	5	112 (96%)	22.4 (96%)	1580 (89%)	291 (94%)
4	8	8.3	183 (124%)	22.0 (124%)	2330 (121%)	281 (121%)
CD	10	8.3	130 (84%)	15.6 (84%)	1545 (89%)	186 (89%)
5	7	12.5	236 (67%)	18.9 (67%)	2936 (67%)	235 (68%)
Фикс.	9	560 мг фиксированная доза	122 (29%)	---	1553 (25%)	---

AUC = площадь под кривой;

CD = непрерывное дозирование;

C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства

a - нижний предел количественного определения составил 0.050 нг/мл для PCI-32765

На День 1 значения площади под кривой были установлены от 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) и в стационарном состоянии (steady-state) от 0 до 24 ч после дозирования (AUC_{0-24h}). Значения C_{max} и AUC увеличивались с увеличением дозы от 1.25 до 12.5 мг/кг на День 1 и в стационарном состоянии. Нормализованные по дозе значения C_{max} и AUC в стационарном состоянии в целом показали дозопропорциональные увеличения, однако большие, чем дозопропорциональные увеличения, наблюдались при уровне дозы 2.5 мг/кг на День 1 и в стационарном состоянии. Время достижения максимальной концентрации в плазме (T_{max}) колебалось от 1.0 до 2.3 ч. Средний период полувыведения соединения формулы D после достижения T_{max} колебался от 1.5 до 2.5 ч. У пациентов, которые получали нормализованные по массе тела дозы (мг/кг/сутки), высокая межсубъектная вариабельность наблюдалась по всем уровням доз в отношении $AUC_{0-\infty}$ на День 1 и среднего значения AUC_{0-24h} в стационарном состоянии (День 8). Введение фиксированной дозы 560 мг/сутки привело к среднему значению системного воздействия соединения формулы D, измеренному как $AUC_{0-\infty}$, которое было промежуточным по отношению к средним воздействиям, измеренным при уровнях доз 5 и 8.3 мг/кг. В стационарном состоянии (День 8) системные воздействия у субъектов, которые получали фиксированную дозу 560 мг, имели меньшую межсубъектную вариабельность (измеренную как коэффициент вариаций для AUC_{0-24h}) при сравнении с воздействиями у субъектов, которые получали нормализованные по массе тела дозы.

Анализ РК и фармакодинамических профилей на День 1 показал, что занятость активного сайта Btk была насыщенной через 4 и 24 ч после дозирования при значениях $AUC \geq 200$ нг·ч/мл. В стационарном состоянии все субъекты, которые получали дозы ≥ 2.5 мг/кг/сутки, имели значения $AUC \geq 245$ нг·ч/мл. Это указывает на то, что несмотря на короткий период полувыведения из плазмы соединения PCI-32765, оно является эффективным необратимым ингибитором в течение по меньшей мере 24 ч и, таким образом, введение один раз в сутки является достаточным для поддержания полной занятости активного сайта Btk.

В CLL, PCI-32765 ингибирует секрецию хемокина и опосредованную хемокином миграцию и адгезию злокачественных клеток. В качестве сравнительного исследования в рамках клинического исследования образцы первичных опухолей пациентов совместно культивировали с клетками, подобными нурзальным, и инкубировали в течение 24 часов с 1 нМ PCI-32765. После обработки секретируемые уровни хемокина CCL3 падали от 393 ± 172 пг/мкл до 54 ± 46 пг/мкл ($p < 0.05$) и уровни хемокина CCL4 падали от 2550 ± 678 пг/мкл до 394 ± 188 пг/мкл ($p < 0.05$). Более того, в культурах первичных CLL, полученных из образцов от пациентов этого же самого клинического исследования, 1 мкМ PCI-32765 уменьшал опосредованный хемокином CXCL12 хемотаксис ($57 \pm 9\%$ контроль, $n=10$) и опосредованный хемокином CXCL13 хемотаксис ($46 \pm 5\%$ контроль, $n=10$). Образцы плазмы от пациентов с CLL по этому исследованию показали высокие уровни хемокинов CCL3/4 до начала лечения, и эти уровни были значительно снижены после лечения: через 24 ч после первой дозы PCI-32765 уровни хемокина CCL3 снизились от 60 ± 29 пг/мл до 16 ± 13 пг/мл, и уровни хемокина CCL4, имеющиеся до начала лечения, снизились от 106 ± 55 пг/мл до 23 ± 12 пг/мл ($n=6$).

Пример 2. Клиническое исследование с использованием PCI-32765 у пациентов с CLL

Фазу Ib/II клинического исследования выполняли для изучения эффектов PCI-32765 на субъектов с рецидивирующим или рефрактерным (R/R) хроническим лимфоцитарным лейкозом/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (CLL/SLL).

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности

Экспериментальная модель: Параллельная оценка

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Группа I (пожилые, ранее не получавшие лечения субъекты) получала 420 мг/сутки PCI-32765.

Группа II (пожилые, ранее не получавшие лечения субъекты) получала 840 мг/сутки PCI-32765.

Группа III (R/R субъекты, которые дважды получали лечение препаратом Флудара) получала 420 мг/сутки PCI-32765.

Группа IV (R/R субъекты, которые дважды получали лечение препаратом Флудара) получала 840 мг/сутки PCI-32765.

Характеристики пациентов приведены в табл. 5 и 6.

Таблица 5. Характеристики пациентов

	Группа I – (ранее не получавшие лечения) 420 мг/сутки (N=26)	Группа II – (ранее не получавшие лечения) 840 мг/сутки (N=5)	Всего (N=31)
Возраст, лет			
Средний:	71 (66 – 84)	71 (65 – 77)	71 (65 – 84)
=70 лет, # (%)	20 (77)	3 (60)	23 (74)
Общее состояние по шкале ECOG, # (%)			
0	18/25 (72)	2 (40)	20/30 (67)
1	7/25 (28)	3 (60)	10/30 (33)
В-2-Микроглобулин > 3 мг/л	7 (27)	0	7 (23)
Цитопения на исходном уровне, # (%)			
Гемоглобин (HGB) < 11 г/дл	8 (31)	2 (40)	10 (32)
Тромбоциты < 100000/мкл	11 (42)	1 (20)	12 (39)
HGB < 11 г/дл или PLT < 100000/мкл	16 (62)	3 (60)	19 (61)
Прогностические маркеры, # (%)			
Немутированный статус IgVH:	11 (42)	2/4 (50)	13/30 (43)
Del(17p):	2 (8)	0	2 (6)

	Группа III - R/R CLL 420 мг/сутки (N=27)	Группа IV - R/R CLL 840 мг/сутки (N=34)	Всего (N=61)
Возраст, лет			
Средний:	64	64	64
Диапазон:	40 - 81	44 - 80	40 - 81
=70 лет, # (%)	9 (33)	10 (29)	19 (31)
Диагноз, # (%)			
CLL:	26 (96)	33 (97)	59 (97)
SLL:	1 (4)	1 (3)	2 (3)
Общее состояние по шкале ECOG, # (%)			
0	11 (41)	13 (38)	24 (39)
1/2	16 (59)	21 (62)	37 (61)
Число предшествующих терапий, #			
Среднее значение:	3	5	4
Диапазон:	2 - 10	1 - 12	1 - 12
Предшествующая терапия, # (%)			
Нуклеозидный аналог	27 (100)	34 (100)	61 (100)
Ритуксимаб	25 (93)	33 (97)	58 (95)
Алкилятор	24 (89)	28 (82)	52 (85)
Алемтузумаб	5 (19)	3 (9)	8 (13)
Бендамустин	8 (30)	13 (38)	21 (34)
Офатумумаб	8 (30)	10 (29)	18 (30)
Генерализованная лимфаденопатия, # (%)			
≥ 5 см	13 (48)	20 (59)	33 (54)
≥ 10 см	1 (4)	9 (26)	10 (16)
Цитопения на исходном уровне, # (%)			
Абс. число нейтрофилов (ANC) < 1500/мкл	7 (26)	17 (50)	24 (39)
Гемоглобин (HGB) < 11г/дл	4 (15)	18 (53)	22 (36)
Тромбоциты < 100000/мкл	8 (30)	24 (71)	32 (52)
HGB < 11г/дл или PLT < 100000 мкл	9 (33)	27 (79)	36 (59)
Рефрактерные к аналогам пурина, # (%) (отсутствие лечения в течение < 12 месяцев после терапии аналогом пурина)	10 (37)	18 (53)	28 (46)
Прогностические маркеры, # (%)			
Немутированный статус IgVH:	19/25 (76)	23/28 (82)	42/53 (79)
Del(17p):	9/24 (38)	11/32 (34)	20/56 (36)
Del(11q):	8/24 (33)	14/32 (44)	22/56 (39)
B-2-Микроглобулин > 3 мг/л	9/25 (36)	20/32 (63)	29/57 (51)

Оценку опухоли выполняли после каждых 2 циклов терапии.

Цели клинического исследования:

1. Описание характеристик противоопухолевого действия PCI-32765 у субъектов с CLL/SLL, например, уменьшения лимфаденопатии/спленомегалии, и кинетики изменения абсолютного числа лимфоцитов (ACL).

2. Обобщение результатов исследования безопасности PCI-32765.

Критерии включения:

Только для групп, не получавших ранее лекарственной терапии: Мужчины и женщины в возрасте ≥ 65 лет с подтвержденным диагнозом CLL/SLL, которым требуется лечение в соответствии с руководствами 11-14 Национального института исследования рака (NCI) или Международной рабочей группы.

Только для рецидивирующих/рефрактерных групп: Мужчины и женщины в возрасте ≥ 18 лет с подтвержденным диагнозом рецидивирующего/рефрактерного CLL/SLL, не отвечающие на терапию (то есть ≥ 2 неудачных предшествующих терапий в отношении CLL/SLL и по меньшей мере 1 схема лечения включала аналог пурина [например, флударабин] для субъектов с CLL).

Масса тела ≥ 40 кг;

Общее состояние по шкале ECOG ≤ 2;

Согласие на использование противозачаточных средств во время исследования и в течение 30 дней после последней дозы исследуемого лекарственного средства в случае сексуальной активности и способности рожать детей;

Желание и способность участвовать во всех требуемых оценках и процедурах данного протокола исследования, включая отсутствие затруднений в проглатывании капсул;

Способность понять цели и риски исследования и предоставить подписанное и датированное информированное согласие и разрешение на использование охраняемой законом информации о состоянии здоровья (в соответствии с национальными и местными законами о конфиденциальности информации о субъектах).

Критерии исключения:

Угрожающее жизни заболевание, общее состояние или системная дисфункция органа, которая, по мнению исследователя, может негативно сказаться на безопасности субъекта, препятствовать абсорбции или метаболизму PCI-32765 PO, или подвергнуть неоправданному риску результаты исследования;

Любая иммунотерапия, химиотерапия, лучевая терапия или экспериментальная терапия в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства (кортикостероиды для связанных с заболеванием симптомов разрешены, но требуется 1 неделя выведения перед введением исследуемого лекарственного средства);

Вовлечение в лимфому центральной нервной системы (CNS);

Обширное оперативное вмешательство в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Креатинин $>1.5 \times$ установленная верхняя граница нормы (ULN); общий билирубин $>1.5 \times$ ULN (если только не по причине болезни Жильбера); и аспаратаминотрансфераза (AST) или аланинаминотрансфераза (ALT) $> 2.5 \times$ ULN, если только не связано с заболеванием;

Сочетанное применение лекарственных средств, которые вызывают синдром удлиненного интервала QT или двунаправленную желудочковую тахикардию;

Значительные аномалии по данным электрокардиографии (ECG), включая блокаду левой ножки пучка, 2 степень блокады AV типа II, 3 степень блокады, брадикардию и QTc > 470 мс;

Кормление грудью или беременность.

Критерии оценки ответа:

Критерий 1 NHL IWG применяется ко всем случаям SLL без изменения.

Критерий 2008 CLL IWG применяется ко всем случаям CLL со следующими изменениями:

1) Изолированный лимфоцитоз, в отсутствие других параметров отвечающий критерию прогрессирующего заболевания (PD), не рассматривался как прогрессирующее заболевание (PD);

2) Пациенты, испытывающие лимфоцитоз, но получающие частичный ответ (PR) по другим измеряемым параметрам, были классифицированы как "нодальный" ответ, пока не было 50%-ного уменьшения абсолютного числа лимфоцитов (ALC) от исходного уровня, и в этом случае они были классифицированы как частичный ответ (PR).

3) У пациентов с нормальным абсолютным числом лимфоцитов (ALC) ($<5K$) на исходном уровне с лимфоцитозом, связанным с лечением, требовалась нормализация до $<5K$ для классификации как частичный ответ (PR).

Результаты

Результаты исследования представлены в табл. 6-11.

Таблица 6. Распределение участников клинического исследования, не получавших ранее лекарственной терапии

	Группа I – Не получавшие лек.терапии 420 мг/сутки (N=26)	Группа II – Не получавшие лек.терапии 840 мг/сутки (N=5)
Субъекты, досрочно выбывшие из исследования, # (%)	4 (15)	1 (20)
Основные причины досрочного выбывания из исследования, # (%)		
Прогрессирование заболевания	1 (4) ^a	0 (0)
Нежелательные явления	2 (8) ^{b,c}	1 (20) ^c
Несвязанные: вирусный синдром		
Несвязанные: Ухудшение ЖК		
кровотечения		
Возможно связанные: утомляемость		
Субъекты, отзывавшие согласие	1 (4) ^d	
"желающие получить более быстрый ответ"		
Смертельные исходы во время исследования, # (%)	0	0

дни приема ибрутиниба:

- a) 280 дней;
- b) 41 дней;
- c) 115 дней;
- d) 41 дней;
- e) 9 дней

Таблица 7. Распределение участников клинического исследования - R/R CLL

	Группа III - R/R CLL 420 мг/сутки (N=27)	Группа IV - R/R CLL 840 мг/сутки (N=34)
Субъекты, досрочно выбывшие из исследования, # (%)	7 (26)	8 (24)
Основные причины досрочного выбывания из исследования, # (%)		
Прогрессирование заболевания	2 (7)	1 (3)
Нежелательные явления	1 (4)	1 (3)
Другие ²	1 (4) ^d	
Смертельные исходы во время исследования ¹	1 (4)	2 (6)

¹Причина смерти: 1 пневмония, 1 острый респираторный дистресс-синдром (ARDS)/криптококковая пневмония, 1 ретикулоклеточная саркома

²Другие: 5 трансплантат, 1 диагностирован немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) на день 5, 1 прием не включенного в исследование лекарственного средства > 2 недель

Таблица 8. Наилучший ответ - не получавшие ранее лекарственной терапии

	Группа I - Не получавшие лек.терапии 420 мг/сутки (N=26) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 14.4 мес. #(%)	Group II - Не получавшие лек.терапии 840 мг/сутки (N=5) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 7.4 мес. #(%)	всего (N=31) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 12.8 мес. #(%)
CR (полный ответ)	3 (12)	0	3 (10)
PR (частичный ответ)	18 (69)	2 (40)	20 (65)
ORR (частота объективного ответа) (согласно критерию IWCLL 2008)	81%	40%	74%
Нодальный ответ	3 (12)	1 (20)	4 (13)
SD (стабильное течение заболевания)	1 (4)	1 (20)	2 (6)
PD (прогрессирующее течение заболевания)	0	0	0
NE (не установлено)	1 (4)	1 (20)	2 (6)

Таблица 9. Наилучший ответ - R/R CLL

	Группа III - R/R CLL 420 мг/сутки (N=27) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 14.4 мес. #(%)	Группа IV - R/R CLL 840 мг/сутки (N=34) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 7.4 мес. #(%)	Всего (N=31) Средняя продолжительность последующего врачебного наблюдения (f/u) = 12.8 мес. #(%)
CR (полный ответ)	1 (4)	0	1 (2)
PR (частичный ответ)	17 (63)	23 (68)	40 (66)
ORR (частота объективного ответа на терапию) (согласно критерию IWCLL 2008)	67%	6 %	67%
Нодальный ответ	6 (22)	8 (24)	12 (23)
SD (стабильное течение заболевания)	1 (4)	1 (3)	2 (3)
PD (прогрессирующее течение заболевания)	1 (4)	0	1 (2)
NE (не установлено)	1 (4)	2 (6)	3 (5)

Таблица 10. Наилучший ответ по характеристикам риска - не получавшие ранее лекарственной терапии

	N	Частота объективного ответа на терапию (ORR), % (n)	Полный ответ (CR), % (n)
Все пациенты	31	74 (23)	10 (3)
Возраст ≥ 70 лет	23	70 (16)	13 (3)
Hgb < 11 г/дл или PLT < 100К/мкл при скрининге	19	79 (15)	11 (2)
Немутированный статус IgVH	13	92 (12)	15 (2)
Присутствует делеция Del17p	2	100 (2)	0 (0)
$\beta 2$ -Микроглобулин > 3 мг/л	7	86 (6)	29 (2)

Таблица 11. Наилучший ответ по характеристикам риска - R/R CLL

	n/N	Частота объективного ответа на терапию (ORR), %
Все пациенты	41/61	67
Возраст ≥ 70 лет	13/19	68
Массивное поражение (bulk disease) ≥ 5 см	24/33	73
Массивное поражение (bulk disease) ≥ 10 см	7/10	70
Hgb < 11 г/дл или PLT < 100К/мкл при скрининге	22/36	61
Немутированный статус IgVH	31/42	74
Присутствует делеция Del17p	13/20	65
присутствует делеция Del11q	16/22	73
$\beta 2$ -Микроглобулин > 3 мг/л	19/29	66
Рефрактерный к аналогу пурина (>12 мес после терапии любым аналогом пурина до следующей терапии)	17/28	61

Результаты этого исследования далее обобщены на фиг. 2-7. На фиг. 2 показан ответ лимфатического узла (LN) у пациента, страдающего CLL, до и после лечения с помощью PCI-32765. На фиг. 3 показано уменьшение опухолевой массы после курса терапии с помощью PCI-32765 у пациентов с R/R CLL, проводимой в дозе 420 мг/сутки или 840 мг/сутки PCI-32765. На фиг. 4 представлено абсолютное число лимфоцитов (ALC) и сумма произведений наибольших диаметров (SPD) лимфатических узлов (LN) во время курса терапии с помощью PCI-32765 у пациентов, ранее не получавших лекарственной терапии или имеющих R/R CLL, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765. На фиг. 5 представлен суммарный наилучший ответ на лечение у пациентов, ранее не получавших лекарственной терапии, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения (циклы 2, 5, 8, 11 и лучший ответ). На фиг. 6 представлен суммарный наилучший ответ у пациентов с R/R CLL, которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения (циклы 2, 5, 8, 11 и лучший ответ). На фиг. 7 представлено сравнение суммарного наилучшего ответа у пациентов с R/R CLL (RR) с пациентами, ранее не получавшими лекарственной терапии (TN), которым вводили 420 мг/сутки PCI-32765 в течение последовательных циклов лечения. Выводы:

Предварительные данные Фазы II подтверждают, что PCI-32765 является высоко активным как у пациентов, не получавших ранее лекарственной терапии, так и у пациентов с рецидивирующей/рефракторной CLL/SLL. Класс-специфическое быстрое уменьшение лимфатических узлов с сопутствующим лимфоцитозом наблюдается у большинства пациентов. Согласно IWG CLL 2008, объективные ответы на терапию (частичный ответ (PR) + полный ответ (CR)) и нодальные ответы оказались длительными и не зависящими от геномных признаков высокого риска. Высокая доля (86%) рецидивирующих или рефрактерных пациентов не имеют прогрессирования в течение 12 месяцев (кагорта, получавшая 420 мг).

Пример 3. Исследование во время длительного последующего наблюдения субъектов, получавших PCI-32765

Целью данного исследования является определения длительной безопасности схемы, предусматривающей ежедневный прием фиксированной дозы PCI-32765, у субъектов с В-клеточной лимфомой или хроническим лимфоцитарным лейкозом/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (CLL/SLL).

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности

Экспериментальная модель: Оценка одной группы

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Введение: 420 мг/сутки PCI-32765

Состояния, в отношении которых применяется: В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз; мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; диффузная высокодифференцированная лимфоцитарная лимфома; В-клеточная лимфома; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; неходжкинская лимфома; макроглобулинемия Вальденстрема; лимфома Беркитта; В-клеточная диффузная лимфома
Первичные конечные точки исследования:

Нежелательные явления/Безопасная переносимость [Период проведения: в течение 30 дней после последней дозы исследуемого лекарственного средства] - частота, степень тяжести и связь нежелательных явлений с исследуемым лекарственным средством

Вторичные конечные точки исследования:

1. Ответ опухоли [Период проведения: частота оценки опухоли соответствует стандарту лечения] - ответ опухоли оценивается согласно установленным критериям ответа. В данном исследовании фиксируется время до прогрессирования заболевания и длительность ответа.

2. Ответ опухоли [Период проведения: Время до прогрессирования заболевания] - Длительность ответа, измеренная с помощью установленного критерия ответа для В-клеточной лимфомы и хронического лимфоцитарного лейкоза

Критерии включения:

Мужчины и женщины с В-клеточной лимфомой или хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL)/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL), которые имеют стабильное течение заболевания или ответ на PCI-32765 PO (порошкообразный) в течение по меньшей мере 6 месяцев в предшествующем исследовании PCI-32765 и желают продолжить лечение исследуемым лекарственным средством, или которые имели прогрессирующее течение заболевания в исследовании PCYC-04753 и желают попробовать более высокую дозу;

Общее состояние по шкале Восточной Объединенной Онкологической группы США (ECOG) ≤ 2 ;

Согласие на использование противозачаточных средств во время исследования и в течение 30 дней после приема последней дозы исследуемого лекарственного средства в случае сексуальной активности и способности рожать детей;

Желание и способность участвовать во всех требуемых оценках и процедурах в данном протоколе исследования, включая отсутствие затруднений при проглатывании капсул;

Способность понять цели и риски исследования и предоставить подписанное и датированное информированное согласие и разрешение на использование охраняемой законом информации о состоянии здоровья (в соответствии с национальными и местными законами о конфиденциальности информации о субъектах) .

Критерии исключения:

Угрожающее жизни заболевание, общее состояние или системная дисфункция органа, что по мнению исследователя может негативно сказаться на безопасности субъекта, препятствовать абсорбции или метаболизму PCI-32765 PO или подвергнуть неоправданному риску результаты исследования

Сопутствующая иммунотерапия, химиотерапия, лучевая терапия, кортикостероиды (при дозах, эквивалентных преднизону > 20 мг/день) или экспериментальная терапия;

Сочетанное применение лекарственных средств, которые вызывают синдром удлиненного интервала QT или двунаправленную желудочковую тахикардию;

Вовлечение в лимфому центральной нервной системы (CNS);

Креатинин $> 1.5 \times$ установленная верхняя граница нормы (ULN); общий билирубин $> 1.5 \times$ ULN (если только не по причине болезни Жильбера) и аспаратаминотрансфераза (AST) или аланинаминотрансфераза (ALT) $> 2.5 \times$ ULN, если только не связано с заболеванием;

Кормление грудью или беременность.

Пример 4. Фаза II исследования PCI-32765 у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL)

Целью данного исследования является оценка эффективности PCI-32765 у субъектов с рецидивирующей/рефрактерной MCL, которые ранее не получали бортезомиб и которые получали ранее бортезомиб. Вторичной целью является оценка безопасности схемы, предусматривающей ежедневное дозирование фиксированной дозы PCI-32765 в форме капсул в этой популяции.

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности/эффективности

Экспериментальная модель: Параллельная оценка

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Введение: 560 мг/сутки PCI-32765

Первичные конечные точки исследования

Оценка некоторого количества участников, имеющих ответ на исследуемое лекарственное средство [Период выполнения: Участники будут оставаться под наблюдением до прогрессирования заболевания]

или до начала другой противораковой терапии].

Вторичные конечные точки исследования

1. Оценка некоторого количества участников, имеющих нежелательные явления как показатель безопасности и переносимости [Период проведения: Участники будут оставаться под наблюдением до прогрессирования заболевания или начала другой противораковой терапии];

2. Оценка фармакокинетики некоторого количества участников для содействия в определении, каким образом организм отвечает на исследуемое лекарственное средство [Период проведения: Процедура выполняется в течение первого месяца получения исследуемого лекарственного средства];

3. Анкета с оценками результатов, полученными от участников [Период проведения: Участники будут оставаться под наблюдением до прогрессирования заболевания или начала другой противораковой терапии];

4. Оценка полученных от некоторого количества участников анкет с оценками результатов для определения связанного с состоянием здоровья качества жизни.

Критерии включения:

Мужчины и женщины в возрасте ≥ 18 лет

Общее состояние по шкале ECOG ≤ 2

Патологически подтвержденная MCL с документально подтвержденной сверхэкспрессией циклина D1 или t(11;14), и измеряемые проявления болезни на изображении поперечного разреза, а именно ≥ 2 см в самом длинном диаметре, и измеряемые в 2 перпендикулярных направлениях;

Документально подтвержденная неудача в достижении, по меньшей мере, частичного ответа (PR) во время самой последней схемы лечения или документально подтвержденное прогрессирование заболевания впоследствии;

По меньшей мере 1, но не более 5 предшествующих схем лечения MCL (Примечание: Субъекты, получившие ≥ 2 циклов предшествующей терапии бортезомибом в качестве монотерапии или в составе комбинированной схемы лечения, будут рассматриваться как подвергшиеся воздействию бортезомиба);

Желание и способность участвовать во всех требуемых оценках и процедурах в данном протоколе исследования, включая отсутствие затруднений в проглатывании капсул;

Способность понять цели и риски исследования и предоставить подписанное и датированное информированное согласие, и разрешение на использование охраняемой законом информации о состоянии здоровья (в соответствии с национальными и местными законами о конфиденциальности информации о субъектах).

Основные критерии исключения:

Предшествующая химиотерапия в течение 3 недель, нитрозомочевины в течение 6 недель, терапевтические противораковые антитела в течение 4 недель, радио- или токсин-иммуноконъюгаты в течение 10 недель, лучевая терапия в течение 3 недель или обширное оперативное вмешательство в течение 2 недель до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Любое угрожающее жизни заболевание, общее состояние или системная дисфункция органа, что, по мнению исследователя, может негативно сказаться на безопасности субъекта, препятствовать абсорбции или метаболизму капсул PCI-32765 PO, или подвергнуть неоправданному риску результаты исследования;

Клинически значимое сердечно-сосудистое заболевание, такое как неконтролируемая или симптоматическая аритмия, застойная сердечная недостаточность или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга, или любое кардиологическое заболевание Класа 3 или 4, определенное по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации

Синдром мальабсорбции, заболевание, значительно поражающее желудочно-кишечную функцию, или резекция желудка или тонкого кишечника, или язвенный колит, симптоматическое воспалительное заболевание кишечника, или полная кишечная непроходимость;

Любое из следующих лабораторных отклонений от нормы: абсолютное число нейтрофилов (ANC) < 750 клеток/ мм^3 ($0.75 \times 10^9/\text{л}$), если только не зафиксировано вовлечение костного мозга; число тромбоцитов < 50000 клеток/ мм^3 ($50 \times 10^9/\text{л}$), независимо от поддержки гемотрансфузией, если только не зафиксировано вовлечение костного мозга; сывороточная аспартаттрансаминаза (AST/SGOT) или аланин-трансаминаза (ALT/SGPT) $\geq 3.0 \times$ верхняя граница нормы (ULN); креатинин $> 2.0 \times$ ULN.

Характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в табл. 12 и 13 ниже

Таблица 12

	Ранее не получали терапию Бортезомибом (N=41)	Получали терапию Бортезомибом (N=27)	Всего (N=68)
Возраст: Средний:	66	69	67
Диапазон:	47-83	54-83	47-83
Пол: Мужской	31 (76)	23 (85)	54 (79)
Время от первичного диагноза, # (%)			
<3 лет до 1-й дозы	20 (49)	6 (22)	26 (38)
≥3 лет до 1-й дозы	21 (51)	21 (78)	42 (62)
Состояние здоровья по шкале ECOG: 0	24 (59)	13 (48)	37 (54)
1	12 (29)	12 (44)	24 (35)
2	5 (12)	2 (7)	7 (10)
Количество предшествующих схем лечения, # (%)			
Среднее	2	3	2
Диапазон	1-5	1-5	1-5
<3 режимов	28 (68)	11 (41)	39 (57)
≥3 режимов	13 (32)	16 (59)	29 (43)

Таблица 13

	Ранее не получали терапию Бортезомибом (N=41)	Получали терапию Бортезомибом (N=27)	Всего (N=68)
Предшествующая высокоинтенсивная терапия, # (%)			
Химиотерапия Нерг-CVAD	17 (41)	11 (41)	28 (41)
Трансплантация стволовых клеток	5 (12)	2 (7)	7 (10)
Консервативная терапия препаратами платины	2 (5)	0 (0)	2 (3)
Прогностический индекс MIPI, # (%)			
Низкий риск	7 (17)	3 (11)	10 (15)
Промежуточный риск	16 (39)	10 (37)	26 (38)
Высокий риск	17 (41)	11 (41)	28 (41)
Массивное поражение (bulky disease) (размер опухолевой массы ≥10 см LD), # (%)	5 (12)	4 (15)	9 (13)
Стадия IV заболевания, # (%)	32 (78)	23 (85)	55 (81)
Рефрактерное заболевание*, # (%)	14 (34)	13 (48)	27 (40)

MIPI=MCL Международный прогностический индекс;

LD=Самый длинный диаметр

*Рефрактерное заболевание = неудача в достижении, по меньшей мере, частичного ответа (PR) на последнюю терапию до начала исследования

Распределение пациентов для исследования представлено в табл. 14.

Таблица 14

	Ранее не	Получали	Всего
	получали терапию Бортезомибом (N=41)	терапию Бортезомибом (N=27)	(N=68)
Продолжительность участия в исследовании (мес), #			
Кол-во	36	25	61
Среднее	3.7	3.7	3.7
Диапазон	0.9-7.0	0.7-7.5	0.7-7.5
Пациенты, все еще находящиеся на лечении в программе исследования	29 (71)	19 (70)	48 (71)
Пациенты, досрочно прервавшие лечение, # (%)	12 (29)	8 (30)	20 (29)
Основные причины для досрочного прерывания лечения, # (%)			
Прогрессирование заболевания	7 (17)	6 (22)	13 (19)
Нежелательное явление	2 (5)	1 (4)	3 (4)
Решение спонсора	1 (2)	0 (0)	1 (1)
Решение исследователя	2 (5)	1 (4)	3 (4)
Смертельные исходы в период исследования¹, # (%)	0 (0)	1 (4)	1 (2)

¹Причина смертельных исходов: пневмония

Результаты:

Результаты наилучшего ответа для пациентов с рецидивирующей или рефрактерной MCL, не получавших ранее терапию бортезомибом и получавших терапию бортезомибом, представлены на фиг. 19 и в табл. 15 ниже.

Таблица 15

	n/N	Частота объективного ответа (ORR), %
Все пациенты	35/51	69
Массивное поражение (bulky disease)	4/7	57
Рефрактерная		
Да	14/21	67
Нет	21/30	70
Число предшествующих терапий рака		
<3 схем лечения	23/30	77
≥3 схем лечения	12/21	57
Предшествующая высокоинтенсивная терапия		
Да	22/31	71
Нет	13/20	65
Прогностический индекс MIPI:		
Низкий риск	6/8	75
Промежуточный риск	13/20	65
Высокий риск	15/20	75

PCI-32765 индуцировал высокую частоту ответа в случае рецидивирующей или рефрактерной MCL и был ассоциирован с благоприятным профилем безопасности. Значительной миелосупрессии у пациентов во время исследования не наблюдалось.

Пример 5. Фаза II исследования PCI-32765+офатумумаб в рецидивирующем/рефрактерном хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL)

Целью данного исследования является определение эффективности и безопасности схемы терапии, предусматривающей ежедневное пероральное введение фиксированной дозы PCI-32765 в комбинации с офатумумабом, у субъектов с рецидивирующим/рефрактерным CLL/SLL и связанными заболеваниями.

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности

Экспериментальная модель: Оценка одной группы

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Введение: 420 мг/сутки PCI-32765, стандартная доза офатумумаба

Состояния, к которым применяется: В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз; мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; диффузная высокодифференцированная лимфоцитарная лимфома; пролимфоцитарный лейкоз; трансформация Рихтера

Первичные конечные точки исследования:

Ответ и безопасность PCI-32765 [Период проведения: В конце циклов 1 и 3]

Частота ответа, определенная согласно последним рекомендациями по хроническому лимфоцитарному лейкозу

Вторичные конечные точки исследования:

1. Фармакокинетические/Фармакодинамические оценки [Период проведения: в течение 1-2 циклов]
2. Фармакодинамика PCI-32765 (то есть занятость лекарственного средства Btk и эффект на биологический маркер 1/2) PCI-32765

3. Ответ опухоли [Период проведения: в конце Циклов 2, 4 и 6 (28 дней для каждого цикла)]

4. Общая частота ответа, определенная с помощью последних рекомендаций по CLL

Критерии включения:

Субъекты с гистологически подтвержденным хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL), пролимфоцитарным лейкозом (PLL), определенные согласно классификации ВОЗ гематопозитических неоплазм, или трансформацией Рихтера, возникшей из CLL/SLL, и удовлетворяющие ≥ 1 из следующих условий:

Прогрессирующая спленомегалия и/или лимфаденопатия, идентифицированная с помощью физического обследования или рентгенографических исследований; Анемия (<11 г/дл) или тромбоцитопения ($<100000/\text{мкл}$) по причине вовлечения костного мозга;

Присутствие непреднамеренной потери массы $>10\%$ в течение предшествующих 6 месяцев;

Степень 2 или 3 утомляемости по классификации NCI CTCAE;

Повышенная температура >100.5 степени или ночные приливы в течение >2 недель без признаков инфекции

Прогрессирующий лимфоцитоз с увеличением на $>50\%$ в течение 2-х месячного периода или предполагаемое время удвоения <6 месяцев

Необходимость в циторедукции до трансплантации стволовых клеток

Субъекты должны иметь неудачу в ≥ 2 предшествующих терапиях CLL, включая аналоги нуклеозидов, или ≥ 2 предшествующих терапиях, не включающих аналоги нуклеозидов в случае наличия противопоказаний для такой терапии

$>10\%$ экспрессии CD20 на опухолевых клетках

Состояние здоровья по шкале ECOG ≤ 2

Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 12 недель

Субъекты должны иметь функцию органа или костного мозга, как определено ниже:

Абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1000/\text{мкл}$ в отсутствие вовлечения костного мозга, тромбоциты $\geq 30000/\text{мкл}$, общий билирубин $\leq 1.5 \times$ установленная верхняя граница нормы, если только не по причине болезни Гиблерта, AST(SGOT) $\leq 2.5 \times$ установленная верхняя граница нормы, если только не по причине инфильтрации печени, креатинин ≤ 2.0 мг/дл OR клиренс креатинина ≥ 50 мл/мин

Отсутствие истории предшествующей анафилактической реакции на ритуксимаб

Возраст ≥ 18 лет - Масса тела ≥ 40 кг

Способность проглатывать капсулы без затруднения и отсутствие истории синдрома малабсорбции, заболевания, значительно поражающего желудочнокишечную функцию, или резекция желудка или тонкого кишечника, или язвенный колит, симптоматическое воспалительное заболевание кишечника, или частичная или полная непроходимость кишечника.

Критерии исключения:

Угрожающее жизни заболевание, общее состояние или системная дисфункция органа, что по мнению исследователя может негативно сказаться на безопасности субъекта, препятствовать абсорбции или метаболизму PCI-32765 PO, или подвергнуть неоправданному риску результаты исследования;

Любая противораковая иммунотерапия, химиотерапия, лучевая терапия или экспериментальная терапия в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства. Кортикостероиды для связанных с заболеванием симптомов разрешены при условии 1 недели периода вымывания;

Вовлечение в лимфому центральной нервной системы (CNS) - Обширное оперативное вмешательство в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Кормление грудью или беременность;

История предшествующей злокачественной опухоли, за исключением излечения базально-клеточного или сквамозно-клеточного рака кожи, рака шейки матки in situ или другого рака, в той мере, в которой это возможно, благодаря которому субъект не имел заболевания по меньшей мере в течение 2 лет, или которое не будет ограничивать выживаемость < 2 годами

История токсичности степени ≥ 2 (отличной от алопеции), продолжающейся в результате предшествующей противораковой терапии.

Характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в табл. 16 и 17 ниже.

Таблица 16

		(N=27)
Возраст, лет	Средний:	66
	Диапазон:	51-85
	≥ 70 лет, # (%)	12 (44)
Диагноз, # (%)	Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)	22 (81)
	Мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL)	1 (4)
	Пролимфоцитарный лейкоз (PLL)	1 (4)
	Синдром Рихтера	3 (11)
Общее состояние по шкале ECOG, # (%)	0	10 (37)
	1	17 (63)
Число предшествующих терапий	Среднее:	3
	Диапазон:	2-10
	≥ 3 режимов	16 (59)
Стадирование mRai, # (%)	Низкий риск	1 (4)
	Промежуточный риск	13 (48)
	Высокий риск	13 (48)

Таблица 17

	(N=27) (%)
Резистентный к аналогу пуринов, # (%)	11 (41)
Цитопения на исходном уровне, # (%)	
Абсолютное число нейтрофилов (ANC) < 1500/мкл	4 (15)
Гемоглобин (HGB) < 11 г/дл	9 (33)
Тромбоциты < 100000/мкл	9 (33)
HGB < 11 г/дл или PLT < 100000 мкл	13 (48)
Прогностические маркеры, # (%)	
Немутированный статус IgVH	20/22 (91)
Делеция Del(17p):	10 (37)
Делеция Del(11q):	9 (33)

Данные по распределению пациентов представлены в табл. 18.

Таблица 18

Таблица 10	
	(N=27)
Последующее наблюдение Среднее (месяцы)	9.8
Диапазон	5.2-12.9
Пациенты, все еще находящиеся на исследовании, # (%)	24 (89)
Пациенты, досрочно выбывшие из исследования, # (%)	3 (11)
Основные причины досрочного выбывания из исследования, # (%)	
Направление на трансплантацию	1 (4)
Прогрессирование заболевания	1 (4)
Смертельный исход	1 (4)

Результаты:

Результаты наилучшей частоты ответа показаны в табл. 19. На фиг. 20 показана мобилизация лим-

фоцитов и уменьшение размера лимфатических узлов после лечения с помощью PCI-32756 или комбинированной терапии с офатумумабом. Комбинированная терапия снизила общее число лимфоцитов в крови. На фиг. 21 показана гистология ответа костного мозга у пациента.

Таблица 18

	CLL/SLL/PLL (N=24)	Ритуксера (N=3)
	# (%)	# (%)
Полный ответ (CR)	1 (4%)	0
Частичный ответ (PR)	23 (96%)	2 (67%)
Частота объективного ответа (ORR)	100%	67%
Стабильное течение заболевания (SD)	0	1 (33%)
Прогрессирующее течение заболевания (PD)	0	0
Не установлено (NE)	0	0

PCI-32756 в комбинации с офатумумабом хорошо переносился и являлся высокоактивным у пациентов с R/R CLL/SLL/PLL. У 6 пациентов оценивали дозо-лимитирующую токсичность (DLT) по окончании цикла 2. 0 DLT наблюдалось у этих пациентов. По завершении цикла 3 у 4 пациентов проводили сканирование и анализ крови. 3 из 4 отвечали на лечение согласно критерию IWG. Среди пациентов с CLL/SLL/PLL комбинированная терапия привела к 100% ORR вне зависимости от геномики.

Пример 6. Фаза II исследования PCI-32765 в комбинации с ритуксимабом в рецидивирующем/рефрактерном хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL)

Пациенты с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) с признаками заболевания высокой степени риска имеют более короткие ремиссии и слабый результат при использовании обычной химиотерапии, в особенности в случае рецидивирующего заболевания. Ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTK), ибрутиниб (PCI-32765), препятствует передаче сигнала через В-клеточный рецептор (BCR) и является потенциально успешной новой таргетной терапией для пациентов со зрелыми В-клеточными злокачественными опухолями, в особенности для пациентов с CLL. Данные, полученные на Фазе 1/2 клинических испытаний, показали, что пациенты с CLL высокого риска отвечали, равно как и пациенты с низким риском, на ибрутиниб. Пациенты с CLL, которым проводили монотерапию ибрутинибом, проявляли характерные замедленную реакцию или стабильное течение заболевания по причине персистирующего лимфоцитоза, вызванного перераспределением тканевых резидентных клеток CLL в периферическую кровь. Для ускорения и улучшения ответов, а также для расширения при применении ибрутиниба у пациентов высокого риска CLL проводили Фазу 2 одноцентрового клинического исследования ибрутиниба плюс ритуксимаб.

Пациенты получали 420 мг ибрутиниба перорально (PO) раз в день в комбинации с ритуксимабом (375 мг/м^2) раз в неделю в течение 1-4 недель (цикл 1), затем ибрутиниб раз в день плюс ритуксимаб раз в месяц до цикла 6, с последующей монотерапией ибрутинибом раз в день. Для включения в исследование требовалось заболевание высокого риска (del17p или мутация TP53 [подвергавшиеся или не подвергавшиеся лечению]), пациенты с беспрогрессивной выживаемостью (PFS) < 36 месяцев после химиотерапии первой линии или с рецидивирующим CLL с del11q.

Характеристики пациента включали средний возраст 65 лет (диапазон 35-82); в среднем 2 предшествующих терапии, 14 пациентов женского пола и 26 мужского пола. Средний показатель по методу RAI составил 4 (диапазон 1-4), $\beta 2$ -микроглобулин 4.2 мг/л ($2.2 - 12.3$), 31 пациент имел немутированный статус IGHV, только один пациент имел мутированный статус IGHV, остальные пациенты имели неубедительные результаты в отношении IGHV. 19 пациентов имели del17p или мутацию TP53 (4 без предшествующей терапии), и 13 пациентов имели del11q. При последующем наблюдении в среднем в течение 4 месяцев 38 пациентов из 40 продолжили терапию без прогрессирования заболевания. 1 пациент умер от несвязанного инфекционного осложнения и один пациент отозвал информированное согласие до начала лечения. Из 20 пациентов, пригодных для оценки раннего ответа через 3 месяца, 17 пациентов достигли частичной ремиссии (PR) при частоте объективного ответа (ORR) 85%, и трое достигли PR с персистирующим лимфоцитозом. Примечательно, что в испытании этой комбинации лимфоцитоз, обусловленный перераспределением лимфоцитов, достигал максимума раньше и длительность была короче (см. чертеж), чем при монотерапии ибрутинибом, предположительно по причине добавления ритуксимаба.

Лечение хорошо переносилось, только с 13 случаями степени 3 (n=11) или степени 4 (n=2) токсичностей, которые были, как правило, не связаны с основным заболеванием и временными, такими как нейтропения, утомляемость, пневмония (n=1), бессонница и боль в костях. Анкеты выявили улучшенное общее состояние здоровья и качество жизни после 3 циклов лечения у оцениваемых пациентов (n=21). Заключение: ибрутиниб в комбинации с ритуксимабом является безопасной, хорошо переносимой схемой лечения для пациентов с CLL высокого риска, которая дает очень высокую частоту ранних ответов.

Пример 7. Фаза I исследования PCI-32765 в комбинации с бендамустином и ритуксимабом у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфомой

Данная фаза I исследования разработана для определения максимально переносимой дозы, дозо-

лимитирующей токсичности (DLT), токсичностей и предварительной эффективности R-бендамустина в комбинации с ибрутинибом у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной неходжкинской лимфомой (NHL).

Критерии отбора включали пациентов с рецидивирующими/рефрактерными фолликулярной лимфомой (FL), лимфомой маргинальной зоны (MZL), лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL), трансформированной неходжкинской лимфомой (NHL) и диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL), а также пациентов с MCL, ранее не получавших лечение, не являющихся кандидатами на трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT). Для включения в исследование требовалось, чтобы абсолютное число нейтрофилов (ANC) $> 1000/\text{мм}^3$, тромбоциты $> 50000/\text{мм}^3$ и креатинин < 2.0 мг/дл. Допускалась предшествующая трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT), ритуксимаб, бендамустин и ибрутиниб. Лечение состояло из ритуксимаба (R) $375 \text{ мг}/\text{м}^2$ на день 1, бендамустина $90 \text{ мг}/\text{м}^2$ на дни 1 и 2, и увеличивающихся доз ибрутиниба (280 мг или 560 мг) на дни 1-28, каждые 28 дней в течение 6 циклов. На каждый уровень дозы было отобрано шесть пациентов. Отвечающие пациенты могли продолжать прием только ибрутиниба после цикла 6 до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. Пегфилграстим был разрешен для пациентов с нейтропенией 4 степени во время циклов 1-6. Ответ оценивали после циклов 3 и 6 с помощью Международного критерия гармонизации (International Harmonization Criteria, Cheson, JCO 2007).

В исследование было включено одиннадцать пациентов (9 мужчин) в среднем возрасте 72 г (диапазон 45-84), ранее получавших лечение в среднем 3 предшествующими терапиями (диапазон 0-10). Шесть пациентов были рефрактерными к их самой последней терапии, 4 пациента имели предшествующую трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT), 2 пациента получали ранее бендамустин, и 0 пациентов получали ранее ибрутиниб. Другие характеристики включали заболевание III-IV стадии у 82%, увеличенный Международный прогностический индекс (IPI) > 3 у 64%, экстранодальное вовлечение у 64%, массивную аденопатию $> 5 \text{ см}$ у 45%, В-симптомы у 45% и повышенный уровень лактатдегидрогеназы (LDH) у 36%. Гистология включала лимфому из клеток мантийной зоны (MCL) ($n=3$), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) ($n=3$), трансформированную неходжкинскую лимфому (NHL) ($n=2$), фолликулярную лимфому (FL) ($n=2$), лимфому маргинальной зоны (MZL) ($n=1$). Девять пациентов завершили два или более циклов терапии (в среднем 3, диапазон 1-6) ибрутинибом в дозе 280 мг ($n=6$) и ибрутинибом в дозе 560 мг ($n=3$), и 2 пациента, досрочно прервавшие терапию до завершения цикла 1 по причине прогрессирующего течения заболевания (PD) при 280 мг и 560 мг ибрутиниба, были заменены. Шесть пациентов продолжили получать лечение согласно протоколу. 5 пациентов, которые покинули исследование, включали 2 пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL) и трансформированной неходжкинской лимфомой (NHL), которые были заменены по причине прогрессирующего течения заболевания (PD) до завершения цикла 1, 2 пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL) и прогрессирующим течением заболевания (PD) после циклов 3 и 4, и 1 пациента с лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL), получающего 280 мг ибрутиниба с бендамустином ($90 \text{ мг}/\text{м}^2$), который прервал лечение по причине нейтропении 3 степени, продолжающейся > 14 дней, после цикла 4. Дозолимитирующих токсичностей (DLT) не наблюдалось. Осложнения 3-4 степени включали лимфопению (64%), нейтропению (27%), тромбоцитопению (18%), панкреатит (9%), рвоту (9%), опоясывающий герпес (9%) и сыпь (9%). Уменьшения доз ибрутиниба с 280 мг до 140 мг потребовалось 3 пациентам по причине тромбоцитопении 3 степени, панкреатита и сыпи. Уменьшения доз бендамустина до $60 \text{ мг}/\text{м}^2$ потребовалось 1 пациенту по причине тромбоцитопении 3 степени. Приостановка лечения произошла у 4 пациентов по причине тромбоцитопении ($n=1$), нейтропении ($n=1$), панкреатита ($n=1$) и сыпи ($n=1$). Частота объективного ответа на терапию (ORR) составила 38% у 8 оцениваемых пациентов, с 3 пациентами, получавшими лечение согласно протоколу, которые еще не проходили сканирования с целью рестадирования. Ответы включали 2 полных ответа и 1 частичный ответ у 3 пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL). Выводы: Комбинирование ибрутиниба с R-бендамустином хорошо переносится без непредвиденной токсичности и со значительной активностью у пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны (MCL), ранее не получавших лечения, и с рецидивирующей MCL. Для трех дополнительных пациентов уровень дозы будет увеличен до 560 мг и планируется расширенные когорты, испытывающие эту комбинацию, в особенности пациенты с FL, DLBCL и MCL.

Пример 8. Фаза II исследования PCI-32765 в комбинации с бендамустином и ритуксимабом или флударабином/циклофосфамидом/ритуксимабом (FCR) в рецидивирующем/рефрактерном хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL)

Целью данного исследования является установление безопасности перорально вводимого PCI-32765 в комбинации с флударабином/циклофосфамидом/ритуксимабом (FCR) и бендамустином/ритуксимабом (BR) у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL)/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL).

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности

Экспериментальная модель: Оценка одной группы

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Введение: 420 мг/сутки PCI-32765, стандартная схема лечения FCR или BR

Состояния, к которым возможно применение: В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз; мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома; диффузная высокодифференцированная лимфоцитарная лимфома

Первичные конечные точки исследования:

Оценка некоторого количества участников с продолжительной гематологической токсичностью [Период проведения: 8 недель от первой дозы]

Вторичные конечные точки исследования:

1. Оценка некоторого количества участников с нежелательными явлениями в качестве показателя безопасности и переносимости [

Период проведения: В течение 30 дней после последней дозы PCI-32765]

2. Оценка некоторого количества пациентов, которые отвечают на лечение, с помощью измерения увеличения или уменьшения проявления заболевания в лимфатических узлах, и/или результатов анализов крови [

Период проведения: Пациенты могут оставаться на исследовании до завершения последним субъектом из включенных в исследование максимум 12 циклов терапии PCI-32765. Любые субъекты, все еще получающие в это время PCI-32765, могут быть включены в длительное исследование с отслеживанием для продолжения получения капсул PCI-32765]

Критерии включения:

Гистологически подтвержденный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL) и удовлетворение по меньшей мере 1 из следующих критериев для требуемого лечения:

Прогрессирующая спленомегалия и/или лимфаденопатия, идентифицированные путем физического обследования или рентгенографических исследований;

Анемия (<11 г/дл) или тромбоцитопения (<100000 /мкл) по причине вовлечения костного мозга;

Присутствие непреднамеренной потери массы $>10\%$ в течение предшествующих 6 месяцев;

Утомляемость 2 или 3 степени согласно NCI CTCAE;

Температура $>100.5^{\circ}\text{C}$ или ночные приливы в течение >2 недель без признаков инфекции;

Прогрессирующий лимфоцитоз с увеличением на $>50\%$ в течение 2-х месячного периода или прогнозируемое время удвоения <6 месяцев;

От 1 до 3 предшествующих схем терапии для CLL/SLL

Общее состояние больного по шкале ECOG ≤ 1 ;

Возраст ≥ 18 лет;

Желание и способность участвовать во всех требуемых оценках и процедурах в этом протоколе исследования, включая проглатывание капсул без затруднений;

Способность понимать цель и риски исследования и обеспечение подписанного и датированного информированного согласия и разрешения на использование охраняемой законом информации о состоянии здоровья (в соответствии с национальными и местными законами, регулирующими конфиденциальность субъекта).

Критерии исключения:

Любая химиотерапия, терапевтические противоопухолевые антитела (не включая радио- или токсин-иммуноконъюгаты), лучевая терапия или экспериментальная противоопухолевая терапия в течение 4 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства, терапия радио- или токсин-конъюгированным антителом в течение 10 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Сочетанное применение лекарственных средств, о которых известно, что они вызывают синдром удлиненного интервала QT или двунправленную желудочковую тахикардию;

Трансформированная лимфома или трансформация Рихтера;

Любое угрожающее жизни заболевание, состояние здоровья или дисфункция системных органов, что по мнению исследователя может угрожать безопасности субъекта, препятствовать абсорбции или метаболизму PCI-32765 PO или поставить результаты исследования под угрозу;

Любое из следующих отклонений в лабораторных анализах: абсолютное число нейтрофилов (ANC) < 1000 клеток/ мм^3 ($1.0 \times 10^9/\text{л}$); число тромбоцитов $\geq 50000/\text{мм}^3$ ($50 \times 10^9/\text{л}$); сывороточная аспартаттрансаминаза (AST/SGOT) или аланинтрансаминаза (ALT/SGPT) $\geq 3.0 \times$ верхняя граница нормы (ULN); креатинин $>2.0 \times$ ULN или клиренс креатинина <40 мл/мин

Характеристики пациентов, включенных в исследование, показаны в табл. 19 и 20.

Таблица 19

	Ибрутиниб + BR (N=30)
Возраст, лет Средний	61.5
Диапазон	41-82
≥70 лет, # (%)	7 (23)
Диагноз, # (%) CLL	29 (97)
SLL	1 (3)
Общее состояние больного по шкале ECOG, # (%) 0	15 (50)
1	15 (50)
Число предшествующих терапий, # (%) Среднее:	2
Диапазон:	1-3
3 предшествующих схемы:	12 (40)
Массивное поражение (bulky disease), # (%) ≥5 см	16 (53)
Гемоглобин (Hgb) < 11 г/дл или Тромбоциты (PLT) < 100 тыс/мкл при скрининге	14 (47)

Таблица 20

	Ибрутиниб + BR (N=30)
Рефрактерные к аналогу пурина, # (%) (отсутствие лечения в течение ≤12 месяцев после схемы терапии, предусматривающей аналог пурина)	11 (37)
Рефрактерные к бендамустину, # (%) (отсутствие лечения в течение ≤12 месяцев после схемы терапии, содержащей бендамустин)	4 (13)
Прогностические маркеры, # (%)	
Делеция Del(17p)	7 (23)
Делеция Del(11q)	13 (43)
B2-Микроглобулин > 3 мг/л	16 (59)

Распределение пациентов представлено в табл. 21.

Таблица 21

	Ибрутиниб + BR (N=30)
Последующее наблюдение В среднем (месяцев)	8.1
Диапазон	2.7-11.3
Пациенты, все еще находящиеся на исследовании, # (%)	23 (77)
Пациенты, досрочно выбывшие из исследования, # (%)	7 (23)
Основные причины для досрочного выбывания из исследования, # (%)	
Направление на трансплантацию стволовых клеток (SCT)	5 (17)
Прогрессирующее течение заболевания	2 (7)

Обобщенные данные по схеме лечения представлены в табл. 22.

	Ибрутиниб + BR (N=30)
Полученное количество циклов бендамустина	
Среднее значение	6
Диапазон	2-6
Полученное количество циклов ритуксимаба	
Среднее значение	6
Диапазон	2-6
Полученная общая планируемая доза ибрутиниба %	
Среднее значение	97
Диапазон	73-100
Субъекты с изменениями дозы, # (%)	
Бендамустин	7 (23)
Ритуксимаб	0
Ибрутиниб	1 (3)

Результаты:

Результаты наилучшей частоты ответа показаны в табл. 23 и 24. Фиг. 22 показывает мобилизацию лимфоцитов и уменьшение размера лимфатического узла после лечения PCI-32756 или комбинированной терапией с бендамустином и ритуксимабом. Комбинированная терапия уменьшила общее число лимфоцитов в крови.

Таблица 23

	Ибрутиниб + BR (N=30) средний период последующего врачебного наблюдения (f/u) 8.1 мес # (%)
Полный ответ (CR)	4 (13)
Частичный ответ (PR)	24 (80)
Частота объективного ответа (ORR)	93%
Нодальный	1 (3)
Стабильное течение заболевания (SD)	0 (0)
Прогрессирующее течение заболевания (PD)	1 (3)
Не установлено (NE)	0 (0)

Таблица 24

	N	Частота объективного ответа (ORR), %	Полный ответ (CR), %
Все пациенты	30	93	13
Возраст ≥ 70 лет	7	86	29
Число предшествующих терапий = 3 схемы лечения	12	83	0
Гемоглобин (Hgb) < 11 г/дл или Тромбоциты (PLT) < 100 тыс/мкл	14	93	7
Присутствует делеция Del 11q	13	100	15
B2-Микроглобулин > 3 мг/л	16	94	0
Рефрактерные к аналогу пурина	11	91	0
Рефрактерные к бендамустину	4	75	0
Присутствует делеция Del 17p	7	71	14

Введение PCI-32765 в комбинации с бендамустином и ритуксимабом вызывает 93% ORR, если пациенты достигают ответа согласно IWCLL с 13% полных ответов (CR). Дополнительной токсичности не наблюдалось при добавлении PCI-32765 к бендамустину и ритуксимабу. В предыдущих исследованиях комбинированная терапия бендамустином и ритуксимабом достигала только 59% ответа, включая 9% полных ответов (CR). Таким образом, PCI-32765 значительно улучшает лечение при введении в комбинации с бендамустином и ритуксимабом.

Исследования с использованием PCI-32765 в комбинации с FCR у пациентов с CLL/SLL проводятся в настоящее время. 3 пациентов получили лечение во время начального исследования в течение 6 циклов. Лечение хорошо перенесли все 3 пациента с общим ответом 100% (3/3) с 2 подтвержденными MRD-негативными CR (MRD-негативные при 10^{-4}). Все 3 пациента не имеют прогрессирования заболевания после PCI-32765 в период последующего наблюдения в среднем в течение 8.5 месяцев.

Пример 9. Фаза II исследования PCI-32765 в рецидивирующей/рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфоме (DLBCL)

Целью данного исследования является оценка эффективности PCI-32765 в рецидивирующей/рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфоме (DLBCL) подтипа GCB (лимфома из В-клеток герминального центра) и подтипа ABC (лимфома из активированных de novo В-клеток)

Тип исследования: Интервенционный

Порядок распределения участников исследования: Нерандомизированный

Классификация конечных точек исследования: Исследование безопасности

Экспериментальная модель: Оценка одной группы

Маскировка: Открытое исследование

Основная цель: Лечение

Введение: 560 мг/сутки PCI-32765

Первичные конечные точки исследования:

Оценка некоторого количества пациентов с ответом на исследуемое лекарственное средство [Период проведения: В течение 24 недель после первой дозы]. Участники будут наблюдаться до прогрессиро-

вания заболевания или начала другого противоракового лечения.

Вторичные конечные точки исследования:

1. Оценка некоторого количества пациентов с нежелательными явлениями в качестве показателя безопасности и переносимости. [Период проведения: В течение 30 дней после последней дозы PCI-32765]. Участники будут наблюдаться до прогрессирования заболевания или до начала другого противоракового лечения.

2. Оценка фармакокинетики некоторого количества участников для содействия в определении, каким образом организм отвечает на исследуемое лекарственное средство. [Период проведения: Процедуры будут выполняться в течение первого месяца получения лекарственного средства.]

Критерии включения:

Мужчины и женщины в возрасте ≥ 18 лет.

Общее состояние больного по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) ≤ 2 .

Патологически подтвержденная de novo DLBCL; субъекты должны иметь в наличии архивные образцы ткани для рассмотрения центральной комиссией для включения в исследование.

Рецидивирующее или рефрактерное заболевание, определенное как:

1) рецидив заболевания после полной ремиссии (CR) или

2) частичный ответ (PR), стабильное течение заболевания (SD), или прогрессирующее течение заболевания (PD) при завершении схемы лечения, предшествующей включению в исследование (остаточное заболевание): Субъекты должны ранее получить соответствующую схему лечения первой линии. Субъекты с предполагаемым остаточным заболеванием после схемы лечения, непосредственно предшествующей включению в исследование, должны иметь подтвержденную биопсией остаточную DLBCL.

Субъекты, которые не получали высокодозную химиотерапию/аутологичную трансплантацию стволовых клеток (HDT/ASCT), должны быть неподходящими для HDT/ASCT, что определяется соответствием любому из следующих критериев: - Возраст ≥ 70 лет - Диффузная способность легких по монооксиду углерода (DLCO) $< 50\%$ согласно легочной функциональной пробе (PFT)

Фракция выброса левого желудочка (LVEF) $< 50\%$ согласно радиоизотопной вентрикулографии (MUGA)/эхокардиографии (ECHO)

Иная дисфункция органов или сопутствующие заболевания, не позволяющие применять HDT/ASCT по причине недопустимого риска заболеваемости, связанной с проводимой терапией - Отказ субъекта от HDT/ASCT

Субъекты должны иметь ≥ 1 измеряемого (> 2 см в самом длинном направлении) участка заболевания согласно снимку компьютерной томографии (CT).

Критерии исключения:

Трансформированная DLBCL или DLBCL с сопутствующей гистологией (например, фолликулярной лимфомой или лимфомой из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками [MALT]);

Первичная медиастинальная (тимическая) В-крупноклеточная лимфома (PMBL);

Известная лимфома центральной нервной системы (CNS);

Любая химиотерапия, наружная дистанционная лучевая терапия или противоопухолевые антитела в течение 3 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Радио- или токсин-иммуноконъюгаты в течение 10 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Обширное оперативное вмешательство в течение 2 недель до первой дозы исследуемого лекарственного средства;

Любое угрожающее жизни заболевание, состояние здоровья или дисфункция системы органов, что, по мнению исследователя, может угрожать безопасности субъекта или поставить результаты исследования под неоправданный риск;

Клинически значимое сердечно-сосудистое заболевание, такое как неконтролируемая или симптоматическая аритмия, застойная сердечная недостаточность или инфаркт миокарда в течение 6 месяцев до скрининга, или заболевание сердца 3 или 4 класса согласно функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации;

Неспособность к проглатыванию капсул или синдром малабсорбции, заболевание, значительно поражающее желудочно-кишечную функцию, или резекция желудка или тонкого кишечника, или язвенный колит, симптоматическое воспалительное заболевание кишечника, или частичная или полная непроходимость кишечника;

Любое из следующих отклонений в лабораторных анализах:

Абсолютное число нейтрофилов (ANC) < 750 клеток/ мм^3 ($0.75 \times 10^9/\text{л}$), если не зафиксировано вовлечение костного мозга;

Число тромбоцитов $< 50000/\text{мм}^3$ ($50 \times 10^9/\text{л}$), независимо от поддержки гемотрансфузией, если не зафиксировано вовлечение костного мозга;

Сывороточная аспартаттрансаминаза (AST/SGOT) или аланинтрансаминаза (ALT/SGPT) $\geq 3.0 \times$

верхняя граница нормы (ULN);

Креатинин $>2.0 \times \text{ULN}$

Пример 10. Ингибирование роста с помощью PCI-32765 в субпопуляции линий клеток из В-клеточной лимфомы

PCI-32765 ингибировал рост субпопуляции линий клеток из В-клеточной лимфомы со значениями GI_{50} , изменяющимися от 0.1 до 5.5 мкМ (см. табл. 5 ниже).

В клеточных линиях PCI-32765 продемонстрировал слабый синергизм с леналидомидом, бортезомибом, сорафенибом, гемцитабином, дексаметазоном, бендамустином, 3-((диметиламино)метил)-N-(2-(4-гидроксикарбамоил)фенокси)этилбензофуран-2-карбоксамидом и Syk-ингибитором R-406; и дополнительно с таксолом, винкристином, доксорубицином, темсилолимусом и карбоплатином. Тестирование комбинированного препарата в ксенографтах недавно началось; начальный эксперимент на ксенографте DLBCL продемонстрировал большую аддитивность по сравнению с PCI-32765 и бортезомибом.

Обработка клеток первичной CLL с помощью 0.01-100 мкмоль PCI-32765 вызвала:

- 1) зависимый от дозы и времени апоптоз,
- 2) апоптоз, на который не влияют генетические изменения, которые, как известно, прогнозируют слабый ответ на другие агенты, то есть, del11q, del17p и мутационный статус генов IgVH;
- 3) цитотоксичность, сопровождающуюся расщеплением поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) и индукцией активности каспазы-3; и
- 4) апоптоз, который не зависит от присутствия или отсутствия фибронектина или линии стромальных клеток Hs5, что указывает на то, что активность PCI-32765 не была уменьшена влиянием микроокружения.

PCI-32765 ингибировал рост субпопуляции линий клеток из В-клеточной лимфомы со значениями GI_{50} , изменяющимися от 0.1 до 5.5 мкМ (см. табл. 25 ниже).

Таблица 25. Ингибирование роста с помощью PCI-32765 в субпопуляции линий клеток лимфомы человека

Линия клеток В-лимфомы	Происхождение	Подтип	GI_{50} (мкМ)
LY10	DLBCL	ABC	0.10
DHL-6	DLBCL	GCB	0.18
DHL-4	DLBCL	GCB	0.53
DHL-10	DLBCL	GCB	3.7
LY3	DLBCL	ABC (CARD11)	>10
LY19	DLBCL	GCB (CARD11)	>10
DB	DLBCL	na	>10
WSU-NHL	FL-трансформированная	na	0.12
DOHH2	FL-трансформированная	na	0.12
WSU-DLCL2	FL-трансформированная	na	0.5
Ramos	Беркитта	na	5.5
Mino	Клеток мантийной зоны	na	0.15
Granta-519	Клеток мантийной зоны	na	>10
Jeko-1	Клеток мантийной зоны	na	>10

na = данные отсутствуют

Пример 11. Анализ *in vivo* комбинаций ингибитора Btk в клетках DLBCL

Комбинации Btk-ингибитора PCI-32765 и дополнительных противораковых агентов анализировали с использованием клеток DoHH2. DoHH2 представляет собой линию клеток DLBCL (диффузной В-крупноклеточной лимфомы) от пациента с трансформированной фолликулярной лимфомой. Клеточная линия является умеренно чувствительной к PCI-32765. PCI-32765 инкубировали с другими противораковыми лекарственными средствами в течение 2 дней. Анализ представлял собой анализ с окрашиванием аламаровым синим.

Тестируемые комбинации представляли собой:

- PCI-32765 и гемцитабин;
- PCI-32765 и дексаметазон;
- PCI-32765 и леналиномид;
- PCI-32765 и R-406;
- PCI-32765 и темсилолимус;
- PCI-32765 и карбоплатин;
- PCI-32765 и бортезомиб; и
- PCI-32765 и доксорубицин.

Результаты представлены на фиг. 23-25.

Пример 10. Анализ *in vivo* комбинаций ингибитора Btk в клетках ABC-DLBCL

Комбинации Btk-ингибитора PCI-32765 и дополнительных противораковых агентов анализировали с использованием клеток TMD8. Линия клеток TMD8 представляет собой независимую от передачи сигнала NF-κB линию клеток ABC-DLBCL. Линия клеток TMD8 чувствительна к ингибиторам ВТК только при низких нанолярных концентрациях ($GI_{50} \sim 1-3$ нМ). Ингибитор Btk инкубировали с другими противораковыми лекарственными средствами в течение 2 дней. Анализ представлял собой анализ с окрашиванием аламаровым синим.

Тестируемые комбинации представляли собой:

PCI-32765 и CAL-101;
 PCI-32765 и леналиномид;
 PCI-32765 и R-406;
 PCI-32765 и бортезомиб;
 PCI-32765 и винкристин;
 PCI-32765 и таксол;
 PCI-32765 и флударабин и
 PCI-32765 и доксорубицин.

Результаты представлены на фиг. 26-33.

Пример 11. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с BR

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с BR (бендамустин и ритуксимаб) у пациентов с неходжкинской лимфомой. Ингибитор Btk вводили. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили BR.

Пример 12. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с бортезомибом

Клиническое исследование инициировали для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с бортезомибом у пациентов с неходжкинской лимфомой. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили бортезомиб.

Пример 13. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с BR

Клиническое исследование выполняли для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с BR (бендамустин и ритуксимаб) у пациентов с CLL. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили BR.

Пример 14. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с FCR

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с FCR (флударабином, циклофосфамидом, ритуксимабом) у пациентов с CLL. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили FCR.

Пример 15. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с офатумумабом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с офатумумабом у пациентов с CLL. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили офатумумаб.

Пример 16. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с ритуксимабом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с ритуксимабом у пациентов с CLL. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили ритуксимаб.

Пример 17. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с леналидомидом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с леналидомидом у пациентов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными опухолями. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили леналидомид.

Пример 18. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с леналидомидом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с леналидомидом у пациентов с DLBCL, индолентной В-клеточной лимфомой, CLL и множественной миеломой. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили леналидомид.

Пример 19. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с R-CHOP

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин гидрохлорид, винкристин сульфат, преднизон) у пациентов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными опухолями. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили R-CHOP.

Пример 20. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с R-CHOP

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с R-CHOP у пациентов с DLBCL, индолентной В-клеточной лимфомой и макро-

глобулинемией Вальденстрема. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили R-CHOP.

Пример 21. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с темсиролимусом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с темсиролимусом у пациентов с рецидивирующими или рефрактерными В-клеточными злокачественными опухолями. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили темсиролимус.

Пример 22. Клиническое исследование ингибитора Btk в комбинации с темсиролимусом

Клиническое исследование проводили для определения эффектов комбинирования ингибитора Btk (например, PCI-32765) с темсиролимусом у пациентов с MCL, DLBCL и индолентной В-клеточной лимфомой. Вводили ингибитор Btk. После увеличения концентрации лимфоидных клеток в периферической крови вводили темсиролимус.

Пример 23. Анализ *in vitro* ингибитора Btk в комбинации со второй терапией

Комбинации Btk-ингибитора PCI-32765 и второй терапии исследовали с использованием клеток TMD8.

TMD8 представляют собой независимую от передачи сигнала NF-κB линию клеток ABC-DLBCL. Указанная линия клеток чувствительна к ингибиторам BTK только при низких наномолярных концентрациях ($GI_{50} \sim 1-3$ нМ). Ингибитор Btk инкубировали с другими противораковыми лекарственными средствами в течение 2 дней. Анализ представлял собой анализ с окрашиванием аламаровым синим.

Комбинации представляют собой следующие:

PCI-32765 и леналидомид и дексаметазон

PCI-32765 и бортезомиб

PCI-32765 и R-CHOP (циклофосфамид, гидроксидаунорубин, винкристин и преднизон, и, необязательно, ритуксимаб)

PCI-32765 и R-EPOCH (этопозид, доксорубин, винкристин, циклофосфамид, преднизолон и, необязательно, ритуксимаб)

PCI-32765 и R-ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид)

PCI-32765 и офатумумаб

PCI-32765 и ритуксимаб

PCI-32765 и GA101 (Genentech)

PCI-32765 и BR (бендамустин/ритуксимаб)

Пример 24. Фармацевтические композиции

Композиции, описанные ниже, представлены с соединением Формулы (D) в иллюстративных целях; любые из соединений Формул (A), (B), (C) или (D) могут быть использованы в таких фармацевтических композициях. В конкретных примерах соединение представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (то есть PCI-32765/ибрутиниб).

Пример 24а. Парентеральная композиция

Для приготовления парентеральной фармацевтической композиции, пригодной для введения путем инъекции, 100 мг водорастворимой соли соединения формулы (D) (например, PCI-32765/ибрутиниб) растворяли в DMSO и затем смешивали с 10 мл 0.9% стерильного физиологического раствора. Смесь вводили в дозированную лекарственную форму, пригодную для введения путем инъекции.

Пример 24b. Пероральная композиция

Для приготовления фармацевтической композиции для пероральной доставки 100 мг соединения формулы (D) (например, PCI-32765/ибрутиниб) смешивали с 750 мг крахмала. Смесь вводили в пероральную дозированную лекарственную форму, такую как твердая желатиновая капсула, которая пригодна для перорального введения.

Пример 24с. Композиция для сублингвального введения (твердая пластинка для рассасывания)

Для приготовления фармацевтической композиции для буккальной доставки, такой как твердая пластинка для рассасывания, смешивали 100 мг соединения формулы (D) (например, PCI-32765/ибрутиниб) с 420 мг сахарной пудры, 1.6 мл низковязкой кукурузной патоки, 2.4 мл дистиллированной воды и 0.42 мл экстракта мяты. Смесь осторожно перемешивали и заливали в форму для получения пластинки, пригодной для буккального введения.

Пример 24d. Ингаляционная композиция

Для приготовления фармацевтической композиции для доставки путем ингаляции 20 мг соединения формулы (D) (то есть PCI-32765/ибрутиниб) смешивали с 50 мг безводной лимонной кислоты и 100 мл 0.9% раствора хлорида натрия. Смесь вводили в ингаляционное устройство доставки, такое как небулайзер, которое является пригодным для ингаляционного введения.

Пример 24е. Ректальная гелевая композиция

Для приготовления фармацевтической композиции для ректальной доставки 100 мг соединения формулы (D) (то есть PCI-32765/ибрутиниб) смешивали с 2.5 г метилцеллюлозы (1500 мПа), 100 мг ме-

тилпарапена, 5 г глицерина и 100 мл очищенной воды. Полученную гелевую смесь затем вводили в устройства для ректальной доставки, такие как шприцы, которые пригодны для ректального введения.

Пример 24f. Гелевая композиция для местного введения

Для приготовления фармацевтической гелевой композиции для местного введения 100 мг соединения формулы (D) (то есть PCI-32765/ибрутиниб) смешивали с 1.75 г гидроксипропилцеллюлозы, 10 мл пропиленгликоля, 10 мл изопропилмиристата и 100 мл очищенного спирта USP. Полученную гелевую смесь затем вводили в контейнеры, такие как трубки, которые пригодны для местного введения.

Пример 24g. Композиция офтальмологического раствора

Для приготовления фармацевтической композиции офтальмологического раствора 100 мг соединения формулы (D) (то есть PCI-32765/ибрутиниб) смешивали с 0.9 г NaCl в 100 мл очищенной воды и фильтровали с использованием фильтра 0.2 мкм. Полученный изотонический раствор затем вводили в устройства для офтальмологической доставки, такие как контейнеры для глазных капель, которые пригодны для офтальмологического введения.

Пример 25. Влияние PCI-32765 на мобилизацию лимфоцитов в лимфоме из клеток мантийной зоны

Пациенты с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) часто имеют значительные, но временные увеличения циркулирующих в крови лимфоцитов CLL после лечения ибрутинибом, как наблюдается с другими ингибиторами пути В-клеточного рецептора (BCR). Во время Фазы I исследования ибрутиниба сходные эффекты были отмечены среди получавших лечение пациентов с другими типами неходжкинской лимфомы (NHL), включая лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). В этом примере авторы охарактеризовали паттерны и фенотипы клеток, мобилизованных у пациентов с MCL и, кроме того, изучили механизм этого эффекта. Было обнаружено, что клетки периферической крови CD19+CD5+ от пациентов с MCL, получавших лечение ибрутинибом (PCI-32765), через 7 дней имели значительное снижение экспрессии CXCR4, CD38 и Ki67 по сравнению с уровнем до лечения. Кроме того, содержание хемокинов в плазме, таких как MDC, MIP-1 β и CXCL13, уменьшились на 40-60% после одной недели после лечения. С точки зрения механизма авторы обнаружили, что ибрутиниб ингибировал BCR и опосредованную хемокином адгезию и хемотаксис клеточных линий MCL, и дозозависимым образом ингибировал BCR, стимуляции pBtk, pPLC γ 2, pErk или pAkt стромальными клетками и CXCL12/CXCL13. Важно отметить, что ибрутиниб дозозависимо ингибировал псевдоэмпериоплез MCL в сокультуре. Авторы предполагают, что Btk является важным для хоминга клеток MCL во вторичные лимфоидные органы и его ингибирование приводит к выходу злокачественных клеток в периферическую кровь.

Материалы и способы

Образцы биопсии первичной человеческой MCL от пациентов, получавших лечение лекарственным средством: Кровь собирали у пациентов с MCL, включенных в исследования PCYC-04753 или PCYC-1104 в США в соответствии с Руководством по надлежащей клинической практике (GCP) Международной конференции по гармонизации (ICH) и принципами Хельсинской Декларации, с информированным согласием и соблюдением протоколов, утвержденных соответствующим Экспертным советом(ами) организации (Institutional Review Board). Образцы цельной крови собирали в пробирки (BD) с гепарином натрия (CPT), перемешивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 1500 gcf в течение 20 мин на месте сбора. Образцы отправляли вечером в Фармасайклкс (Pharmasydies) в течение 36 ч. В ламинарном боксе моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) удаляли из верхнего слоя пробирок, отмывали PBS и замораживали в 90% FBS + 10% DMSO (Sigma, St Louis, MO) в жидком азоте до использования.

Клеточные линии и исходный материал для ex vivo исследований:

Клеточные линии MCL HBL2 (любезно предоставленные Dr. Wolfram Klapper, Department of Pathology, University of Kiel, Германия), JeKol (любезно предоставленные Dr. Lydia Visser, Department of Pathology, University Medical Center Groningen, Нидерланды) и Mino (DSMZ, Германия) культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, The Netherlands). Клетки Mino для анализа сокультуры и анализов миграции, и линию мышинных стромальных клеток M2-10B4 получали от ATCC и поддерживали в среде RPMI, дополненной 15 или 10% фетальной бычьей сывороткой соответственно. Все реагенты для культивирования клеток были получены от Life Technologies (Grand Island, NY).

Для исследований ex vivo периферическую кровь от пациентов с MCL получали из отделения Гематологии Academic Medical Center (AMC), Амстердам, PBMC выделяли с помощью Ficoll и В-клетки были очищены с использованием MACS с негативным отбором (Miltenyi Biotec). Это исследование было проведено и утверждено Медицинским комитетом AMC по проведению экспериментов на людях (AMC Medical Committee on Human Experimentation). Информированное согласие получали в соответствии с Хельсинской Декларацией (Declaration of Helsinki).

В случае получения информированного согласия в соответствии с Хельсинской Декларацией (Declaration of Helsinki) и подтверждения Экспертного совета организации Национального института здоровья (NIH), периферическую кровь (PB) и биопсии лимфатических узлов (LN) собирали у пациентов с

MCL, ранее не получавших лекарственной терапии (treatment-naïve), включенных в исследование Национального института онкологии (National Cancer Institute Study) #05-C-0170 (<http://clinicaltrials.gov/identifer:NCT00114738>). Парные образцы PB и LN получали в один и тот же день, обрабатывали и параллельно анализировали. Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности (Ficoll Lymphocyte Separation Media; ICN Biomedicals) и замораживали живыми в 90% фетальной бычьей сыворотке (FBS), 10% диметилсульфоксиде (DSMO) (Sigma) в жидком азоте до использования.

Антитела: Антитела, используемые в проточной цитометрии, получали от фирмы BD (San Jose, CA) и использовали в соответствии с инструкциями: CD3-V500, CD19-APCCy7, CD19-APC, CD5-PerCPCy5.5, CD5-FITC, CXCR4-PECy7, CXCR4-PE, CD38-PE, CD62L-PE, CCR7-V450, CXCR3-Alexa488, CXCR5-Alexa647, CD49d-APC, CD29-PE, CD44-V450, CD54-PE, CD11a-APC, CD11c-V450, CD18-FITC, CD40-PECy7, Ki67-Alexa488, легкая к-цепь Ig - APC, легкая λ -цепь Ig - FITC. Антитела, используемые для вестерн-блоттинга: фосфо-p44/42 MAP киназа [T202/Y204] против ERK1 и 2, фосфо-AKT [Ser473] против PKB/AKT (New England Biolabs, Ipswich, MA), фосфо-BTK [Y551] против BTK (BD Biosciences), фосфо-BTK [Y223] против BTK (Epitomics, Burlingame, CA) и фосфо-PLC γ 2 [Y759] против PLC γ 2 (BD Biosciences); анти-ERK2 (C-14; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), анти-AKT (H-136; Santa Cruz Biotechnology), анти-BTK (Clone 53; BD Biosciences), козы F(ab)'₂ античеловеческие IgM (LE/AF; Southern Biotech, Birmingham, AL), кроличьи антимышьиные, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) и HRP-конъюгированные козы антикроличьи (DAKO, Houston, TX).

Соединения и реагенты для экспериментов in vitro: Ибрутиниб получали от фирмы Pharmacyclics (Sunnyvale, CA), R406 от фирмы Axon Medchem (Groningen, Netherlands), вортманин и форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA) получали от фирмы Sigma-Aldrich (St Louis, MO); рекомбинантный человеческий sVCAM-1, человеческий плазменный фибронектин, BSA (фракция V), rhCXCL12 и rhCXCL13 от фирмы R&D Systems (Minneapolis, MN), rhCCL19 и rhCCL21 от фирмы MT-diagnostics (Netherlands, BV) и поли-L-лизин (PLL) от фирмы Sigma-Aldrich.

Фенотипирование MCL:

Замороженные PBMC оттаивали в водяной ванне при 37°C, ресуспендировали в RPMI + 10% FBS и восстанавливали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в 5 мл полипропиленовых пробирках (BD-Falcon) в течение 2 ч перед фенотипированием. PBMC отмывали с помощью PBS + 2% FBS, пеллетировали и ресуспендировали в PBS + 2% FBS, содержащей определяющие фенотип поверхностные антитела. Все окрашивающие коктейли готовили в пробирках в двух экземплярах. Клетки окрашивали в течение 30 мин, отмывали PBS, пеллетировали при 1300 об/мин в течение 5 мин, затем фиксировали в PBS + 1.6% параформальдегид (Electron Microscopy Services, Hatfield, PA). Клетки, подлежащие анализу на пролиферацию Ki67, пермеабилizировали 70% этанолом при -20°C в течение ночи, регидратировали в PBS и окрашивали антителом к Ki-67.

Проточная цитометрия:

Проточный цитофлюориметр BD FACS Canto II (BD, San Jose, CA) использовали для всех сборов данных проточной цитометрии. Прибор эксплуатировали в соответствии с рекомендациями изготовителя. Калибровочные частицы CS&T (BD) использовали ежедневно для измерений базового уровня и воспроизводимости согласно инструкциям изготовителя. Окрашивание проб для фосфопроточной цитометрии выполняли, как описано. Указанные выше антитела использовали с BD CompBead Plus для установления параметров компенсации и равномерности окрашивания антителами. Из каждого окрашиваемого образца собирали 10000 CD19⁺ клеток. Данные анализировали и количественно определяли с использованием программного обеспечения FlowJo7.6 (Tree Star, Ashland, OR).

Анализ сокультур:

Сокультуры стромальных клеток M2-10B4 и В-клеточной линии Mino получали согласно способу Burger et al. Blood. 1999;94(11): 3658-3667. Клетки Mino обрабатывали носителем, коклюшным токсином (Sigma) или ибрутинибом в течение одного часа при 37°C, отмывали средой и затем добавляли в планшеты, содержащие конфлюэнтные монослои стромальных клеток. Сокультуры инкубировали при 37°C в течение 5 ч до вечера для обеспечения миграции клеток Mino под слой стромальных клеток, после чего их тщательно отмывали для удаления немигрировавших клеток. Для сокультур, использующих красители для мечения живых клеток, клетки сначала загружали Alexa Fluor CellTracker (Life Technologies, Grand Island, NY) согласно инструкциям изготовителя. Для микроскопии клетки фиксировали параформальдегидом и закрепляли на предметных стеклах с помощью заключающей среды DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Для количественного определения миграции клеток Mino в сокультурах с помощью проточной цитометрии клетки трипсинизировали и окрашивали APC-Cy7-меченым анти-CD19 антителом (BD Laboratories). Клетки подсчитывали с использованием CountBright Absolute counting beads (Life Technologies) на проточном цитометре BD CantoII.

Полимеризация актина в клетках Mino:

Клетки Mino оставляли для адгезии с покровными стеклами в бессывороточной среде в течение 30 мин при 37°C и затем обрабатывали DMSO, коклюшным токсином или ибрутинибом в течение 1 ч.

Клетки фиксировали параформальдегидом, пермеабилizировали с помощью Triton X-100 и окрашивали Alexa Fluor495-меченым фаллоидином (Molecular Probes, Grand Island, NY). Покровные стекла закрепляли на предметные стекла с использованием заключающей среды Vectashield, содержащей DAPI (Vector Laboratories). Микроскопию выполняли на микроскопе Zeiss Axioplan2 с использованием 63×/1.40 объектива для масляной иммерсии Plan-Apochromat, и изображения получали с помощью камеры Zeiss Axio-Cam MRm CCD, и программного обеспечения AxioVision v.4.8. Для денситометрии делали снимки по меньшей мере 30 клеток для каждого состояния.

Анализ адгезии:

Анализы клеточной адгезии выполняли в основном как описано ранее. В частности, анализы адгезии проводили в трех повторностях на 96-луночных планшетах для EIA/RIA (Costar), покрытых накануне при 4°C содержащим PBS фибронектином в концентрации 10 мкг/мл или VCAM-1 в концентрации 500 нг/мл, 4% BSA, или в течение 15 мин при 37°C поли-L-лизин (PLL) в концентрации 1 мг/мл и блокировали 4% раствором BSA в среде RPMI-1640 в течение 2 ч при 37°C. Клетки предварительно обрабатывали 100 нМ ибрутиниба, 100 нМ вортманнина, 1 мкМ R406, или при 37°C в течение 1 ч в среде RPMI, содержащей 1% BSA. Затем клетки стимулировали 100 нг/мл (Fab')₂ фрагмента козьего античеловеческого IgM или 50 нг/мл PMA и клетки Namalwa в количестве 1.5×10^5 или клетки CLL в количестве 3×10^5 сразу же высеивали в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После тщательной отмывки планшета средой RPMI, содержащей 1% BSA, для удаления неадгезировавших клеток, адгезировавшие клетки фиксировали в течение 10 мин 10% глutarальдегидом в PBS и затем окрашивали в течение 45 мин 0.5% кристаллическим фиолетовым в 20% метаноле. После тщательной отмывки водой краситель элюировали метанолом и поглощение измеряли через 40 мин при 570 нм на спектрофотометре (Multiskan RC spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Philadelphia, PA). Фооновую величину поглощения (без добавления клеток) вычитали. Поглощение за счет неспецифической адгезии, определенное в лунках, покрытых 4% BSA, всегда было меньше чем 10% поглощения анти-IgM-стимулированных клеток. Максимальную адгезию (100%) определяли путем нанесения клеток на лунки, покрытые PLL, без отмывки лунок перед фиксацией. Адгезию предварительно не обработанных анти-IgM-стимулированных клеток нормализовали к 100% и столбцы представляют среднее ± SEM независимых экспериментов, каждый из которых проведен в трех повторностях.

Хемокин-опосредованную адгезию оценивали, как описано выше, за исключением того, что хемокины 100 нг/мл CXCL12, 100 нг/мл CXCL13, 100 нг/мл CCL19 или 100 нг/мл CCL21 соиммобилизировали с 500 нг/мл VCAM-1. Планшеты центрифугировали сразу же после нанесения клеток на планшет, и клетки оставляли для адгезии в течение 2 мин.

Альтернативно, бессывороточные клетки сначала стимулировали и оставляли для адгезии, как описано, и после этого добавляли ибрутиниб (1 мкМ) в течение 2 ч при 37°C и затем планшеты отмывали для удаления несвязанных клеток.

Анализ миграции:

Анализы миграции выполняли в основном, как описано (de Goiter et al. *Immunity*. 2007; 26(1): 93-104; de Goiter et al. *Blood*. 2008; 111(7):3364-3372). В частности, анализы миграции в трех повторностях с системой Трансвелл (размер пор 5 мкм, Costar) покрывали 500 нг/мл VCAM-1. Нижний отдел содержал 100 нг/мл CXCL12. Клетки, предварительно обработанные 100 нМ ибрутиниба при 37°C в течение 1 ч в среде RPMI, содержащей 0.5% BSA, наносили на верхний отдел и оставляли для миграции в течение 2 ч при 37°C. Количество живых мигрировавших клеток определяли с помощью FACS и выражали в виде процента поступления.

Иммуноблоттинг:

Иммуноблоттинг выполняли в основном, как описано (de Rooij et al. *Blood*. 2012; 119(11): 2590-2594; de Goiter et al. *Blood*. 2008; 111(7): 3364-3372). В частности, 10^7 клеток/мл в RPMI предварительно обрабатывали 100 нМ ибрутиниба при 37°C в течение 1 ч. После стимуляции 100 нг/мл фрагмента (Fab')₂ козьего антитела против человеческого IgM или 100 нг/мл CXCL12 в течение 5 мин (или как указано), клетки лизировали непосредственно в буфере для образцов SDS-PAGE. 2×10^5 клеток наносили на 10% гель SDS-PAGE, и подвергали блоттингу с использованием кроличьего анти-фосфо-ERK1/2 (Cell Signaling, Danvers, MA), кроличьего анти-фосфо-AKT, мышинового анти-фосфо-BTK или мышинового анти-β-актина с последующим HRP-конъюгированным козьим анти-кроличьим или кроличьим анти-мышинным антителом, и регистрировали с помощью усиленной хемилюминесценции (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Для подтверждения равной экспрессии и нагрузки блоты соскребали и инкубировали с антителами кроличьими анти-ERK2, кроличьими анти-AKT и мышинными анти-BTK.

Статистический анализ:

Анализы выполняли с помощью программы GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA). Статистически значимые различия определяли с помощью ANOVA со сравнением post hoc Бонферрони, или двусторонний непарный t-тест Стьюдента использовали для определения значимости различий между двумя средними значениями. Одновыборочный t-критерий использовали для определения значимости различий между средними значениями и нормированными значениями (100%). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Результаты

Временное увеличение абсолютного числа лимфоцитов (ALC) после введения ибрутиниба пациентам с MCL

В Фазе I исследования, которое включало пациентов с различными В-клеточными злокачественными опухолями, пациентов с MCL (n=9) обрабатывали ибрутинибом циклами, состоящими из 35 дней, во время которых лекарственное средство вводили один раз в сутки в течение 28 дней с 7-дневными лекарственными каникулами между циклами. В этих условиях наблюдалась циклическая картина увеличения и уменьшения ALC. Это было продемонстрировано увеличением ALC после первых нескольких недель лечения с последующим возвращением к исходному состоянию после 7-дневных лекарственных каникул. Эта циклическая картина ALC продолжалась на протяжении лечения. Во время курса терапий ибрутинибом объемы опухолей, определенные суммой перпендикулярных диаметров (SPD), уменьшились в среднем на 80% во время оценок после 2, 4 и 6 циклов терапий. Таким образом, во время первых 6 циклов лечения наблюдалась пилообразная картина увеличения и уменьшения ALC в периферической крови, сопровождающаяся нодальным ответом у этих пациентов. Такое же увеличение ALC наблюдали в последующем (Фаза 2) исследовании, во время которого пациенты с MCL получали фиксированную дозу 560 мг в сутки без лекарственных каникул. В этом исследовании ALC увеличилось на 100-150% после 2-4 недель терапии лекарственным средством. Увеличение ALC было временным с ощутимыми снижениями ALC, наблюдаемыми в конце второго цикла. Непрерывное понижение ALC наблюдали до схождения на нет в циклах 4-5. Повышенное абсолютное число лимфоцитов (ALC) вызвано увеличением рестриктированных по легкой цепи клеток $CD19^+CD5^+$.

Для определения популяции лимфоцитов, увеличенных с помощью ибрутиниба, PBMC пациентов, выделенные до (D1) и после одной недели терапии (D8), окрашивали CD3, CD19, CD5 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Увеличенные лимфоциты характеризовались как $CD3^+CD19^+CD5^+$, абсолютное число и процентное содержание $CD19^+CD5^+$ клеток в популяции лимфоцитов были значительно увеличены после одной недели терапии ибрутинибом ($p<0.05$), тогда как популяция $CD19^+CD5^-$ не была увеличена. Пример одного пациента показан на фиг. 35, где популяции $CD19^+CD3^-$ и $CD19^+CD5^+$ перед терапиями лекарственным средством составляли 9.29 и 84.4% соответственно и увеличились до 63 и 98.8% после одной недели лечения. Клетки $CD19^+CD3^+CD5^+$ были рестриктированы по легкой цепи (данные не показаны), по-видимому, отражая увеличенную циркуляцию клеток MCL в периферической крови после одной недели лечения лекарственным средством. В некоторых случаях мобилизованные клетки содержали различающиеся субпопуляции малых клеток $CD45^{dim}$, которые также указывают на MCL.

Для подтверждения достижения полного ингибирования целевой ВТК у этих пациентов, занятость активного сайта ВТК ибрутинибом оценивали в PBMC от пациентов с MCL с помощью анализа конкурентного связывания с использованием флуоресцентного зонда. В среднем свыше 90% занятости мишени наблюдалось у пациентов после 1 недели лечения.

Популяция периферических $CD19^+CD5^+$ представляет собой $CXCR4^{lo}CD38^{lo}$ и уменьшена в Ki67 после терапии лекарственным средством

Далее авторы анализировали клетки $CD19^+CD5^+$ на экспрессию CXCR4, хемокинового рецептора, который, как известно, вовлечен в миграцию и хоуминг в ткани. Поверхностная экспрессия CXCR4 была значительно снижена ($p<0.05$) в популяции $CD19^+CD5^+$ после одной недели терапии лекарственным средством (фиг. 36A). Сообщалось, что экспрессия CXCR4 и CD38 у пациентов с CLL была ниже в резидентных клетках лимфатических узлов по сравнению с клетками CLL в периферической крови. Поэтому авторы анализировали экспрессию CXCR4 и CD38 на лимфатических узлах выбранных пациентов и резидентных клетках MCL периферической крови. Экспрессия CXCR4 была ниже в клетках MCL, изолированных из LN, по сравнению с периферической кровью у всех 3 обследуемых пациентов (фиг. 36D). Это согласуется с наблюдаемой вновь циркулирующей популяцией клеток $CXCR4^{lo}$ MCL и согласуется с мобилизованными клетками, происходящими из тканей, таких как LN. Это мнение в дальнейшем подтвердилось значительным уменьшением лимфаденопатии, наблюдаемым в этот же период. Последующее исследование мобилизованной популяции выявило высокую экспрессию $CD38^+$, соответствующую увеличенной экспрессии CD38, обнаруженной в LN-резидентных клетках MCL (фиг. 36B/D). Это начальное увеличение в клетках $CD38^+$ было значительно снижено после терапии в клетках $CD19^+CD5^+$ ($p<0.01$), тогда как клетки $CD19^+CD5^-$ (которые имели стабильно низкую экспрессию CD38) не были значительно изменены (фиг. 36B/C).

Далее авторы изучали изменения маркеров пролиферативного потенциала, а также хоуминг и миграцию в мобилизованные фракции. Межклеточная экспрессия Ki67 была значительно снижена после терапии ($p<0.05$) (фиг. 36C). Фосфорилированный ERK также был уменьшен, как продемонстрировано фосфо-проточной цитометрией, в субпопуляции $CD20^+CD5^+$ от пациентов до и после лечения. Экспрессия pErk была в целом выше в клетках $CD20^+CD5^+$ пациентов с MCL по сравнению со здоровыми добровольцами, и была снижена терапией ибрутинибом (фиг. 36C, внизу), хотя эти различия не были статистически значимыми.

Кроме того, хемокины, важные в хоуминге (MDC, MIP-1 β , CXCL13 и CXCL17), были снижены в среднем на более чем 50% после одной недели лечения. К концу первого цикла лечения, дополнительно к уменьшению MIP-1 β и MDC, также IL-10 и TNF- α были уменьшены на 50% (фиг. 36Е). Ибрутиниб ингибирует псевдоэмпериполез в MCL/стромальной сокультуре.

Временное увеличение ALC у пациентов с MCL, получавших лечение ибрутинибом, может быть вызвано нарушением клеточной адгезии и миграции в пределах лимфатического узла или тканевых компартментах. Для изучения этого авторы использовали сокультуры MCL - стромальных клеток для определения действия лекарственного средства *in vitro*. Первичные клетки MCL или линию клеток Mino выращивали в сокультуре со стромальными клетками костного мозга мышей M2-10B4. Авторы обнаружили, что первичные клетки MCL или клетки Mino, и те и другие прилипают и быстро мигрируют под клетки M2-10B4 (псевдоэмпериполез). Наблюдали значительное ингибирование псевдоэмпериполеза ибрутинибом, как показано с помощью оптической микроскопии, и некоторое количество клеток Mino или первичных клеток MCL, оставшихся в сокультуре, количественно определяли с помощью проточной цитометрии клеток hCD19⁺, собранных путем осторожного отмывания после 4 ч сокультивирования (фиг. 37А и 37В, слева). Ибрутиниб дозозависимо ингибировал миграцию клеток Mino под стромальные клетки, и ингибирование было значительным при 100 нМ ($p < 0.01$) и 1000 нМ ($p < 0.001$). Коклюшный токсин, хорошо изученный ингибитор GPCR, используемый в качестве положительного контроля для ингибирования миграции клеток Mino, значительно ингибировал миграцию при 200 нг/мл ($p < 0.001$). Кроме того, CXCL12, важный хемокин для В-клеточного хоуминга и продуцируемый стромальными клетками, повышал кортикальный актин клеток Mino, как было оценено с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием фаллоидина, и этот ответ был также дозозависимо и значительно ингибирован терапией ибрутинибом при 10 и 100 нМ ($p < 0.001$) (фиг. 37А справа). Ибрутиниб также подавлял полимеризацию актина первичной MCL в сокультуре при 100 нМ ($p < 0.001$) (фиг. 37В, справа). Ибрутиниб ингибирует активность Btk в MCL/стромальной сокультуре и подавляет индуцированную стромальными клетками секрецию хемокина и цитокина.

Для дополнительного понимания действия лекарственного средства на клетки MCL в сокультуре со стромальными клетками клетки Mino обрабатывали лекарственным средством и сокультивировали с мышинными стромальными клетками (M2-10B4) или стимулировали анти-IgM. Ибрутиниб дозозависимо ингибировал pBtk, pPLC γ 2 и pAkt в клетках Mino, взятых отдельно, или в сокультуре с M2 клетками. Концентрации хемокина и цитокина в кондиционированной среде определяли из обработанных ибрутинибом клеточных линий MCL, взятых отдельно, или в сокультуре с M2 стромальными клетками, или стимулированными анти-IgM. Несмотря на отсутствие детектируемой активации сигнальных белков при сокультивировании с M2, клетки Mino увеличивали секреции хемокина и цитокина после стимуляций BCR или сокультивирования. Сходные результаты наблюдали с клеточной линией Jeko. Ибрутиниб дозозависимо и активно подавлял выработку человеческого IL-10, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α , CCL17 и CCL21 после активации BCR или сокультивирования, тогда как мышинные стромальные клетки, взятые отдельно, не вырабатывали человеческие хемокины или цитокины. Аналогично, ибрутиниб подавлял выработку IL-10, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α клеток Jeko1 в сокультуре с M2-10B4 или человеческой линией стромальных клеток HS-5. Эти результаты *in vitro* клеточных линий MCL коррелируют с уменьшением в плазме хемокина/цитокина у пациентов, получавших лечение ибрутинибом.

Ибрутиниб ингибирует BCR- и хемокин-опосредованную адгезию и миграцию *in vitro*.

Авторы измерили прямое действие ибрутиниба на миграцию и адгезию линий клеток Mino, Jeko1 и JVM-1 MCL. Сначала, в этих клетках MCL определяли действие ибрутиниба на передачу сигнала Btk. Как ожидалось, ибрутиниб ингибировал фосфорилирование Btk и нисходящие "downstream" сигнальные белки PLC γ 2, Erk MAP киназа, JNK и Akt после стимуляций анти-IgM и хемокинами CXCL12 и CXCL13. Поверхностную клеточную экспрессию CXCR4, CXCR5, CCR7, поверхностного IgM и интегрина α 4 β 1 подтверждали проточной цитометрией, и последующие анализы *in vitro* адгезии и хемотаксиса выполняли с лекарственным средством. Ибрутиниб значительно ингибировал стимулированную анти-IgM адгезию клеток Jeko1 и HBL1 на фибронектин или VCAM1 при 100 нМ (клинически значимая концентрация ибрутиниба) с более 50-70% ингибированием. Ингибирование адгезии ибрутинибом было также дозозависимым. Аналогично, адгезия обеих, клеток Mino и Jeko1 к VCAM1 или фибронектину была ингибирована ибрутинибом при 100 нМ после активаций CXCL12 или CXCL13. Степень ингибирования была больше в клетках Mino (50-70%), чем в клетках Jeko1 (20-30%). Дополнительно к изменениям в адгезии авторы обнаружили, что ибрутиниб дозозависимо ингибировал CXCL12-индуцированную миграцию клеток Mino, Jeko1 и JVM-1, при этом клетки Mino и Jeko1 были более чувствительными к лекарственному средству, чем клетки JVM-1. Ибрутиниб также значительно ингибировал CXCL13-стимулированную миграцию клеток Mino дозозависимо в интервале от 1 нМ до 1 мкМ.

Затем авторы изучили действие ибрутиниба на передачу сигнала и адгезию в первичных клетках MCL. Фосфорилирование Y223 было увеличено в клетках MCL по сравнению с нормальными В-лимфоцитами, что указывало на повышенную передачу сигнала BCR в злокачественных В-клетках. Ибрутиниб ингибировал pBtk как в первичных клетках MCL, так и в нормальных В-клетках на Y223, участ-

ке аутофосфорилирования Btk и Y551 (тирозин фосфорилированный киназами Src-семейства) и понижал pPLC γ 2 на Y759 и Y1217 при концентрациях 10 нМ и выше. Эти результаты демонстрируют, что ибрутиниб напрямую ингибирует активность Btk в первичных клетках MCL. Важно отметить, что ибрутиниб также ингибировал активированную CXCL12 или CXCL13 адгезию с VCAM1, а также BCR-стимулированную адгезию с фибронектином при 100 нМ в первичных клетках MCL. Степень ингибирования в этих первичных клетках составила около 10-20%, и магнитуа была менее выраженной по сравнению с линиями клеток MCL, но ингибирование было статистически значимым.

Эти исследования в целом демонстрируют, что ибрутиниб ингибирует активированную BCR и CXCL12, CXCL13 адгезию и миграцию в линиях клеток MCL, а также первичных клетках MCL, которые связаны с Btk-ингибированием в этих клетках.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация для применения в лечении гематологической злокачественной опухоли, содержащая:

а) необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101 (т.е. обинутузумаб);

в которой необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм.

2. Комбинация по п.1, в которой размер дозировки необратимого ингибитора Btk составляет приблизительно от 300 до приблизительно 1000 мг/день.

3. Комбинация по п.1, в которой размер дозировки необратимого ингибитора Btk составляет приблизительно от 420 до приблизительно 840 мг/день.

4. Комбинация по п.1, в которой размер дозировки необратимого ингибитора Btk составляет приблизительно от 420 или приблизительно 560 мг/день.

5. Комбинация по п.1, где гематологическая злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль.

6. Комбинация по п.5, где В-клеточная злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

7. Комбинация по п.5, где В-клеточная злокачественная опухоль представляет собой лимфому из клеток мантийной зоны (MCL).

8. Комбинация по п.5, где В-клеточная злокачественная опухоль представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема.

9. Комбинация по п.5, в которой В-клеточная злокачественная опухоль представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL).

10. Комбинация по п.5, в которой В-клеточная злокачественная опухоль представляет собой фолликулярную лимфому (FL).

11. Применение комбинации:

а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

б) GA 101 (т.е. обинутузумаб);

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм,

для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

12. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли, выбранной из лейкоза, лимфопролиферативного нарушения или миелоидного нарушения.

13. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL).

14. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL).

15. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения макроглобулинемии Вальденстрема.

16. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

17. Применение по п.11 для изготовления лекарственного средства для лечения фолликулярной лимфомы (FL).

18. Применение комбинации:

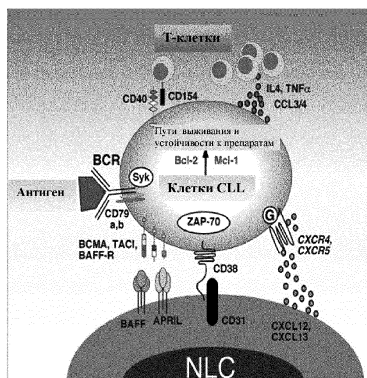
а) необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем необратимый ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk) представляет собой (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-

d) пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он (PCI-32765/ибрутиниб); и

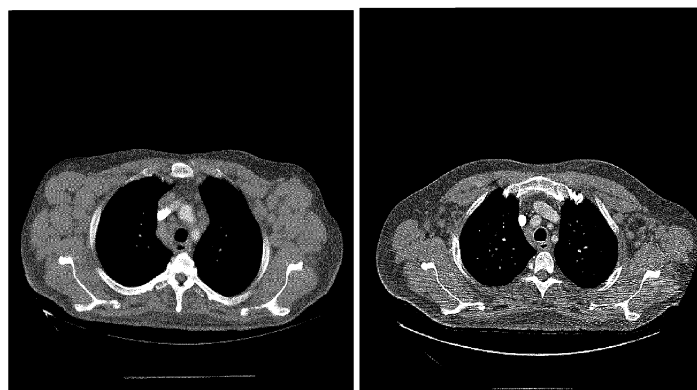
b) GA 101 (т.е. обинутузумаб);

где необратимый ингибитор Btk и GA 101 находятся в виде отдельных лекарственных форм,

для изготовления лекарственного средства для лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, где GA 101 вводят субъекту, когда субъект идентифицирован как имеющий увеличенную мобилизацию множества клеток из злокачественной опухоли после введения необратимого ингибитора тирозинкиназы Брутона (Btk), причем идентификация увеличения мобилизации множества клеток из злокачественной опухоли основана на детекции присутствия, экспрессии или уровня экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CXCR4, Ki67, MDC, MIP-1 β , CXCL-13, CXCL17, IL-10, MIP-1 α , CCL17 и CCL21.



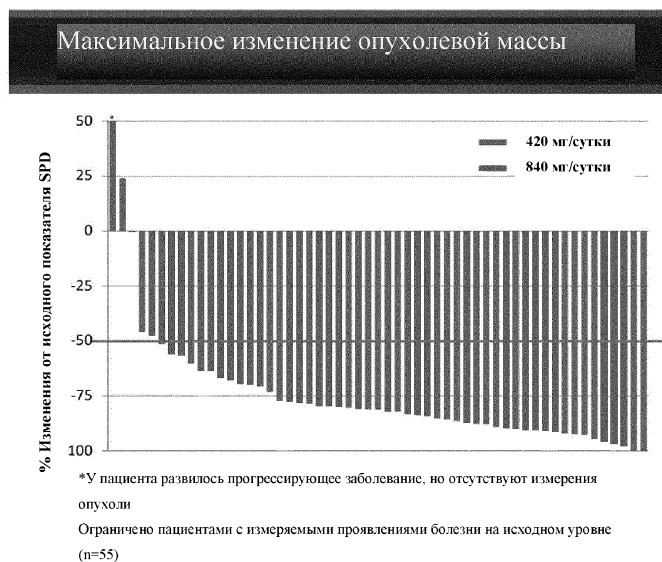
Фиг. 1



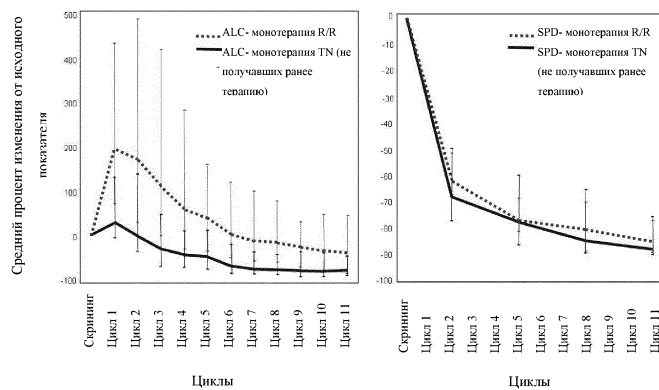
До терапии ингибитором Btk

После терапии ингибитором Btk

Фиг. 2



Фиг. 3

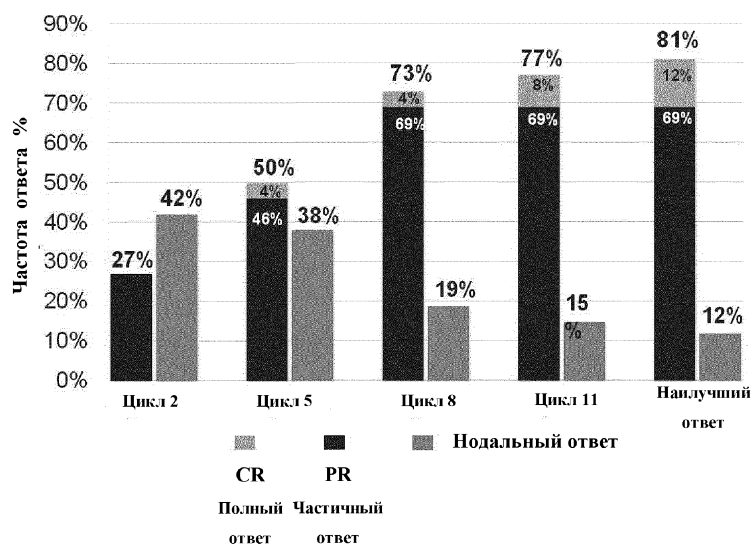


Фиг. 4

Наилучший суммарный ответ –

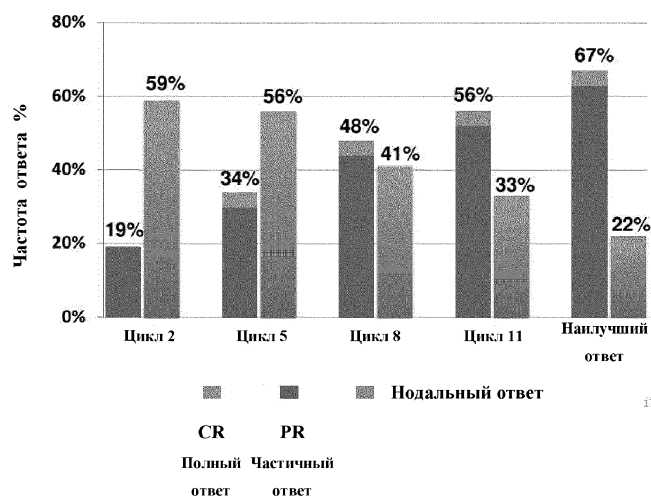
Не получавшие ранее лекарственной терапии пациенты в возрасте ≥ 65 лет

420 мг/сутки, когорта (n=26) – Последующее врачебное наблюдение (f/u) в среднем в течение 14.4 месяцев



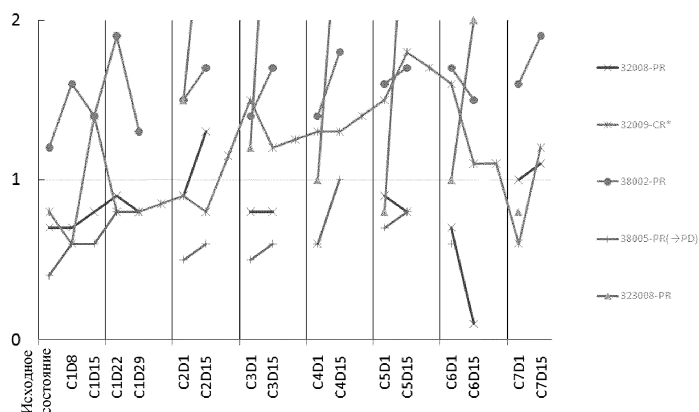
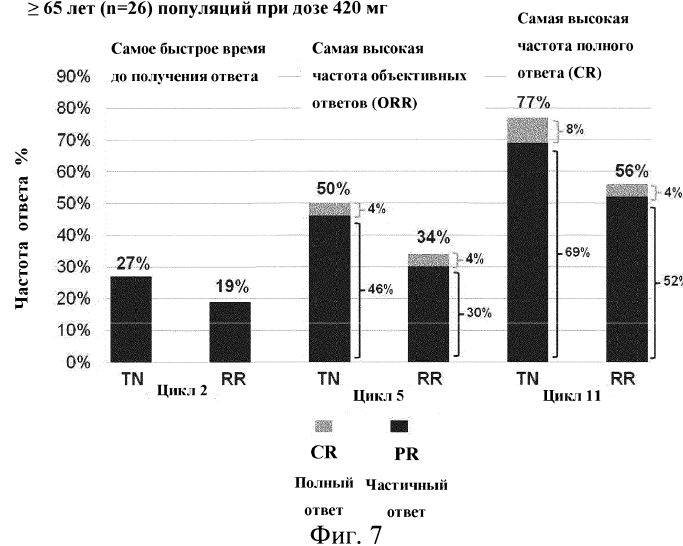
Фиг. 5

Наилучший суммарный ответ
420 мг/сутки, когорта (n=27)



Фиг. 6

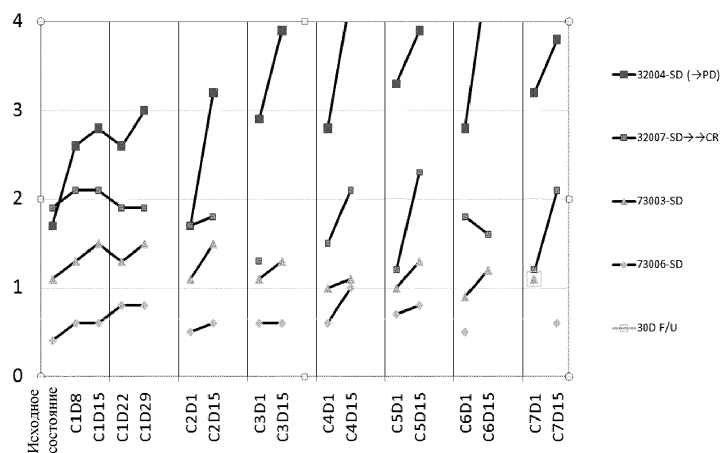
Наилучший суммарный ответ: Сравнение рецидивирующих/рефрактерных (RR) (n=27) и не получавших ранее лекарственной терапии (TN) в возрасте ≥ 65 лет (n=26) популяций при дозе 420 мг



*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

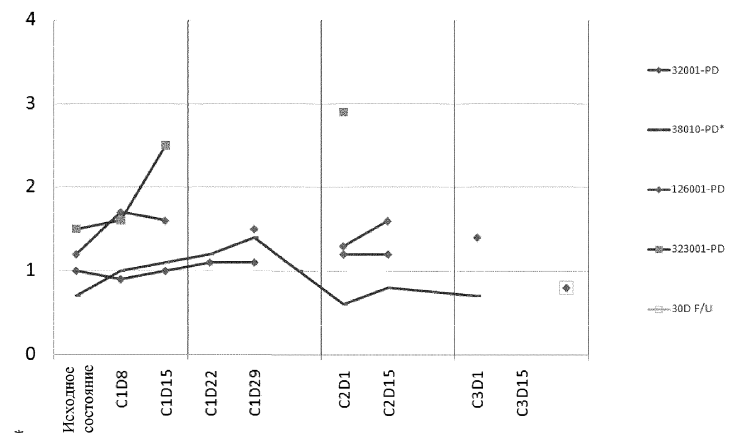
Фиг. 8

Абсолютное число лимфоцитов (ALC)/10⁹ л в зависимости от Дня цикла



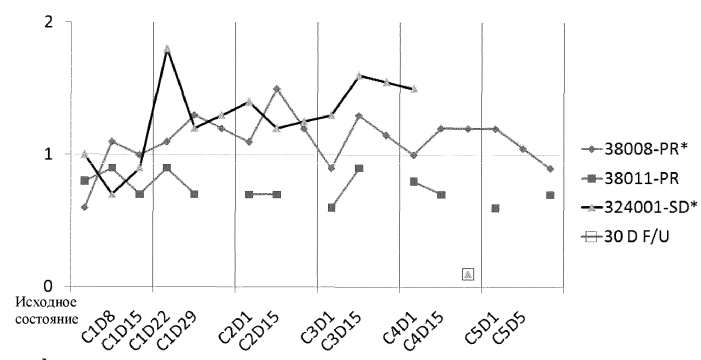
*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

Фиг. 9



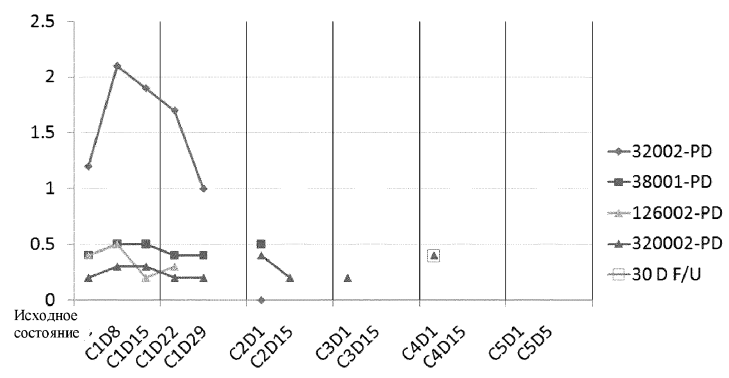
*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

Фиг. 10

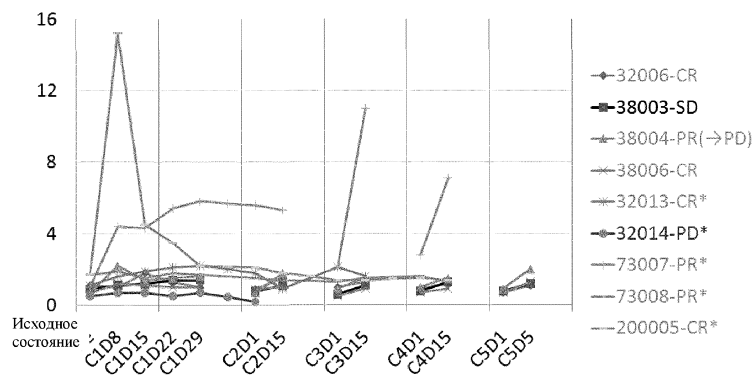


*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

Фиг. 11

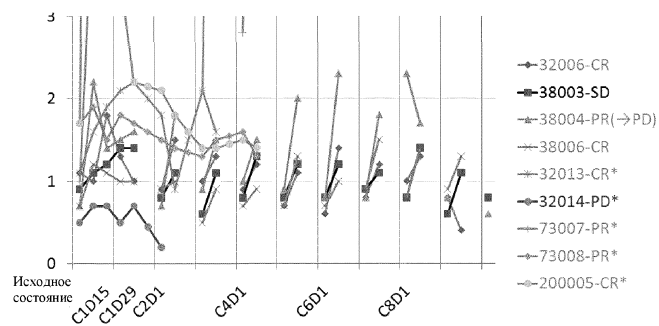


Фиг. 12



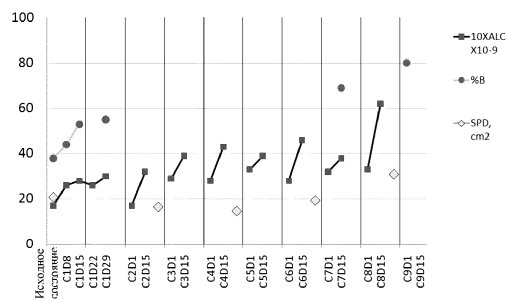
*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

Фиг. 13



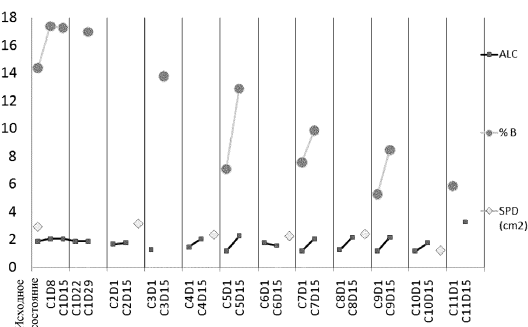
*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

Фиг. 14

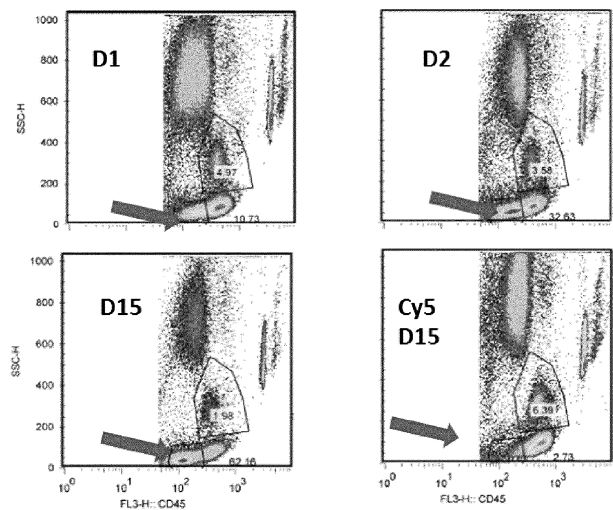


*Непрерывное дозирование, числа между циклами интерполированы

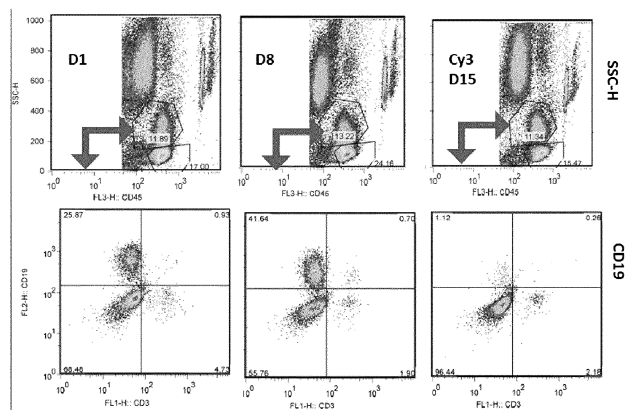
Фиг. 15



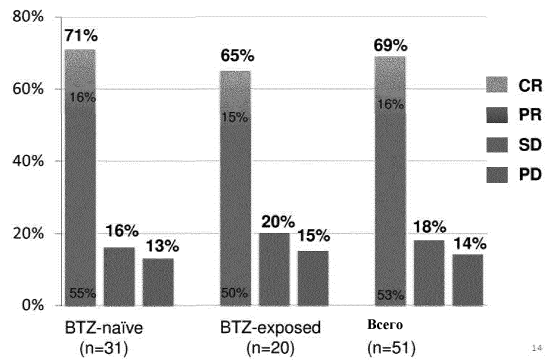
Фиг. 16



Фиг. 17

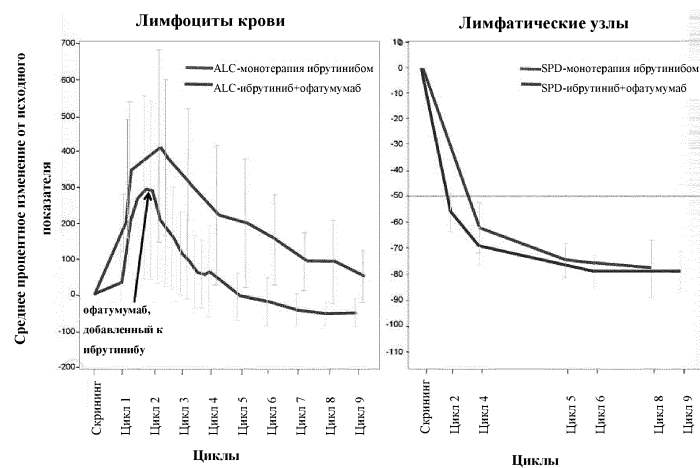


Фиг. 18

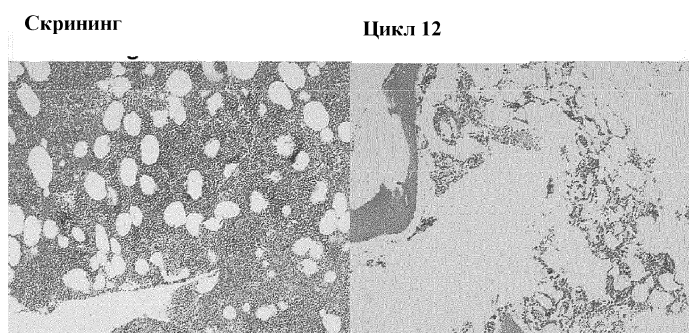


BTZ-naïve – не получавшие ранее терапию бортезомибом
BTZ-exposed – получавшие ранее терапию бортезомибом
CR – полный ответ
PR – частичный ответ
SD – стабильное течение заболевания
PD – прогрессирующее течение заболевания

Фиг. 19

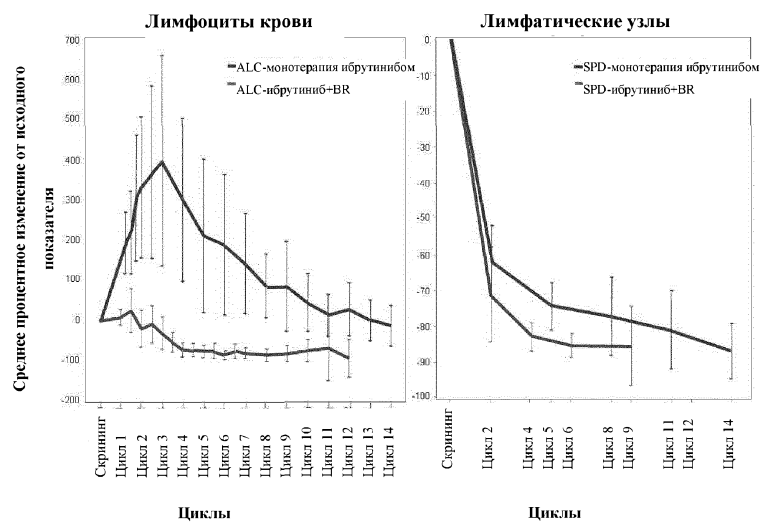


Фиг. 20

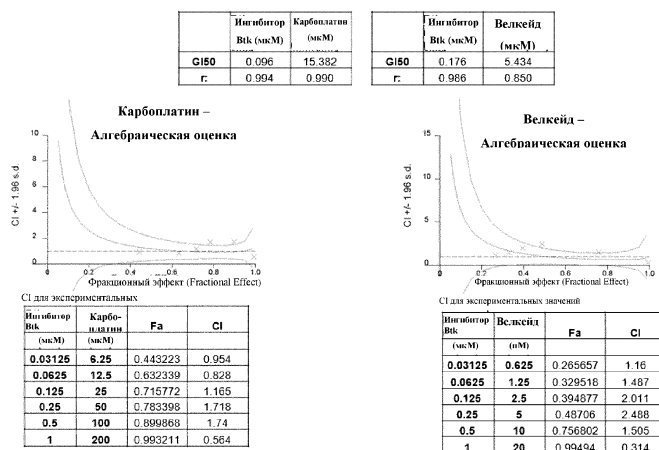


Мужчина в возрасте 77 лет с del17p, C1D1 ALC 145; C12D1

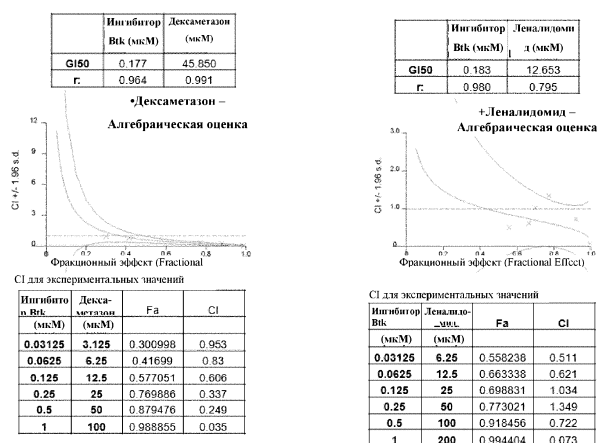
Фиг. 21



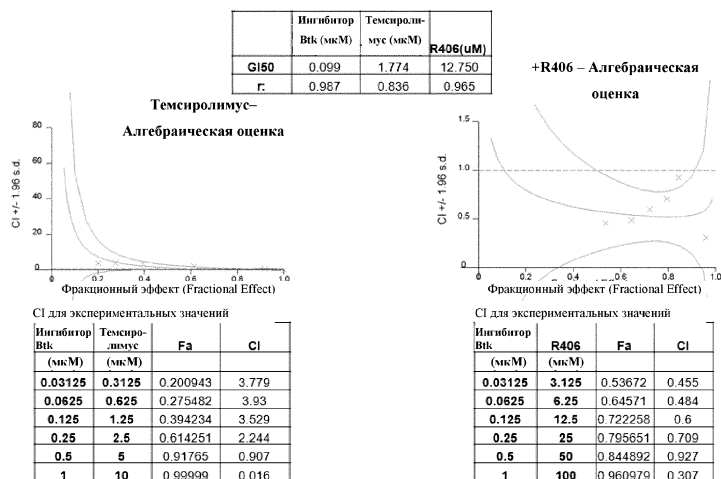
Фиг. 22



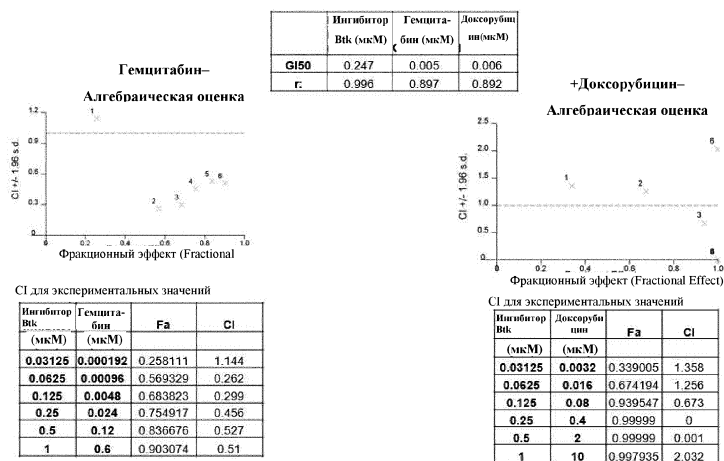
Фиг. 23



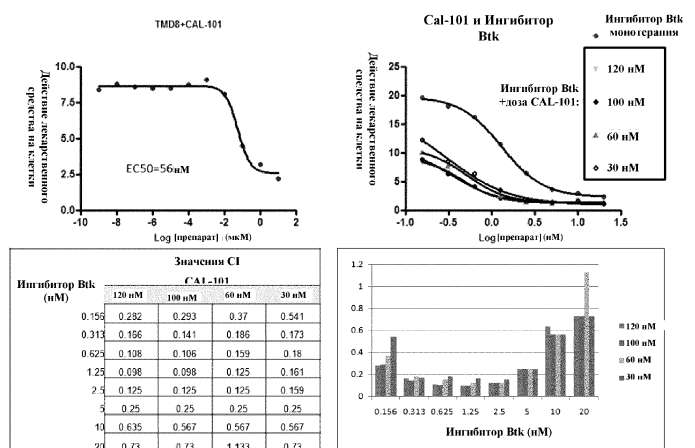
Фиг. 24



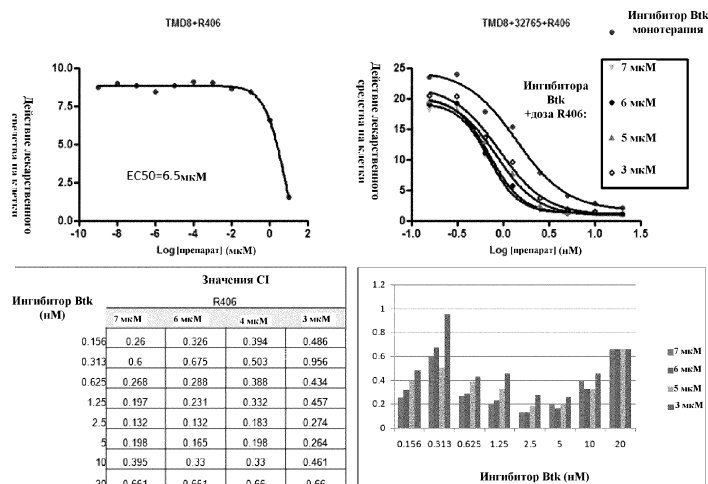
Фиг. 25



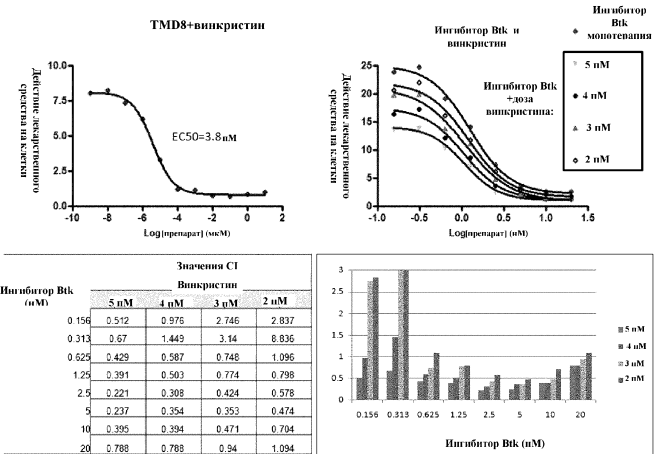
Фиг. 26



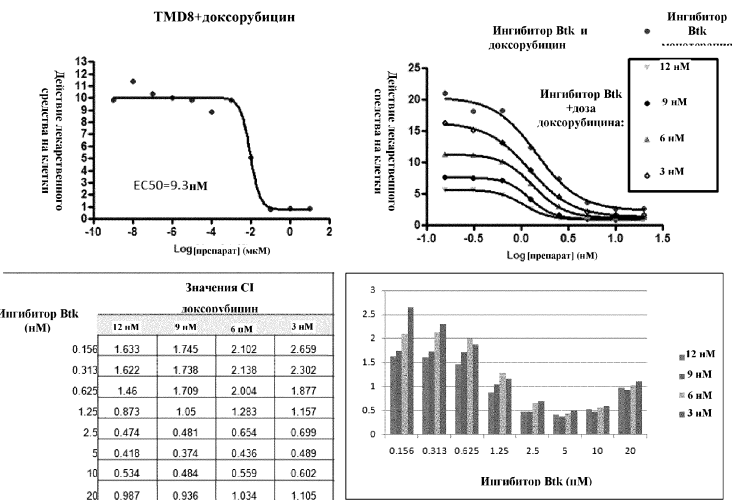
Фиг. 27



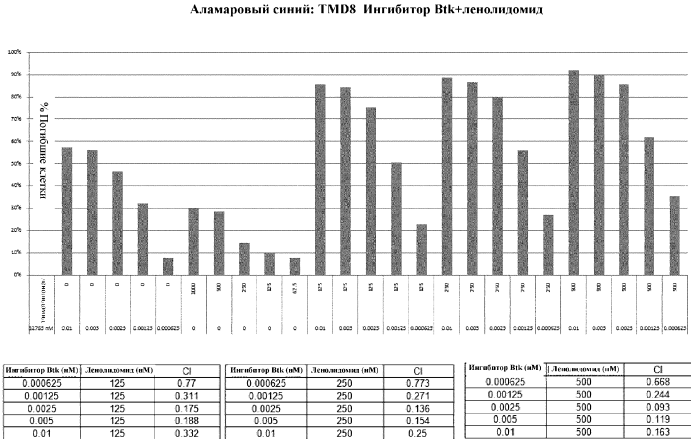
Фиг. 28



Фиг. 29

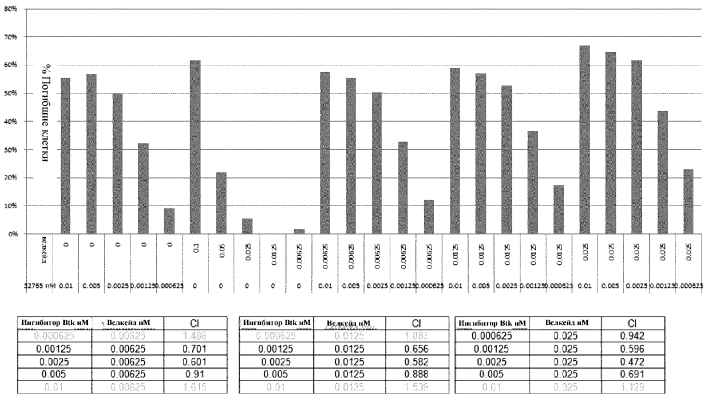


Фиг. 30



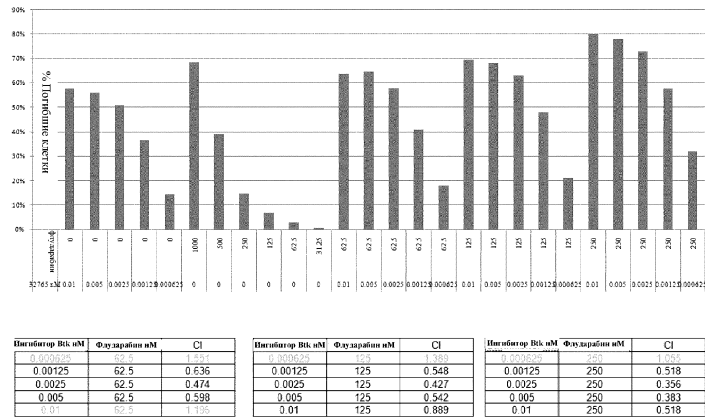
Фиг. 31

Аламаровый синий: TMD8 Ингибитор Btk+велкейд



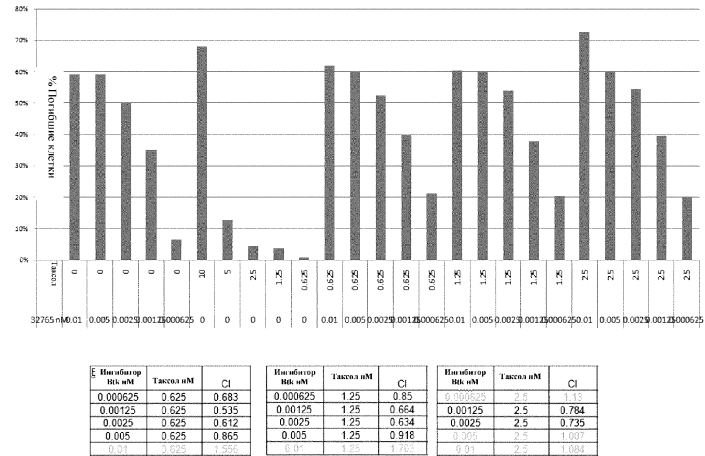
Фиг. 32

Аламаровый синий: TMD8 Ингибитор Btk+Флуларабин

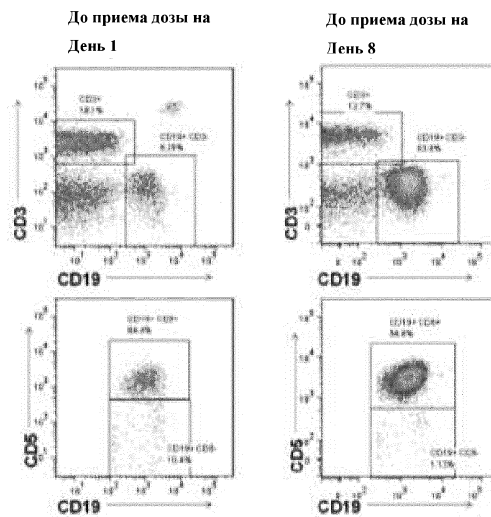


Фиг. 33

Аламаровый синий: TMD8 Ингибитор Btk+Таксол

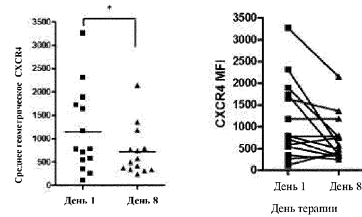


Фиг. 34

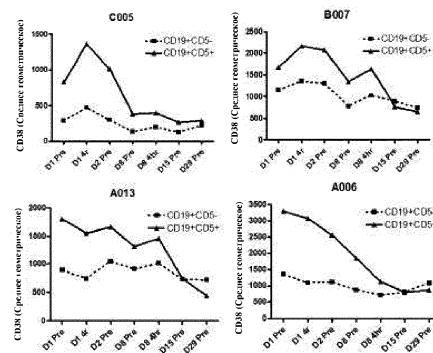


Фиг. 35

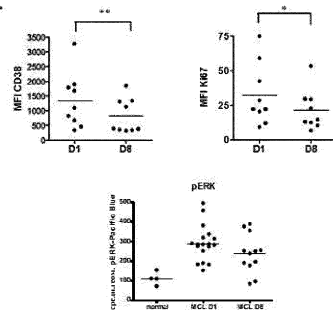
A.



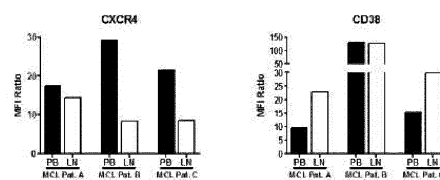
B.



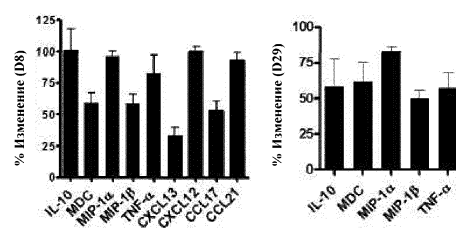
C.



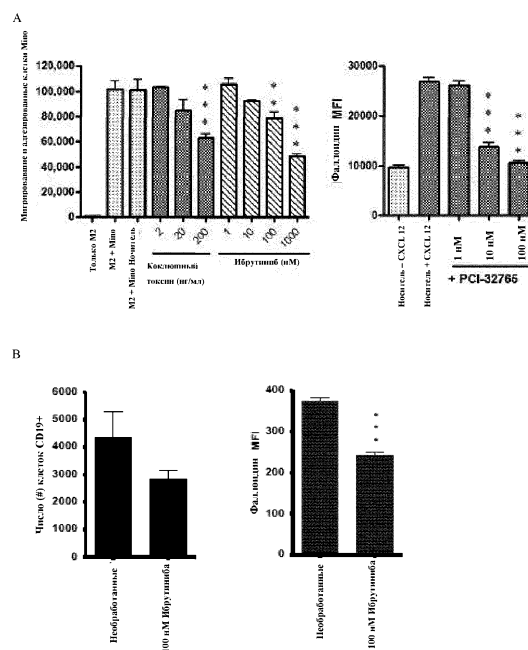
D.



E.



Фиг. 36



Фиг. 37