



(51) МПК  
*A61K 31/5377* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*A61K 31/5377* (2020.08); *A61K 45/06* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08); *A61P 35/02* (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018105923, 19.07.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 19.07.2016

Дата регистрации:  
 18.12.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 20.07.2015 US 62/194,367

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2019 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 18.12.2020 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: 20.02.2018

(86) Заявка РСТ:  
 US 2016/042905 (19.07.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2017/015262 (26.01.2017)

Адрес для переписки:  
 129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
 ООО "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛИХЕНШТЕЙН Хенри (US),  
 РОТБЕРГ Джонатан М. (US),  
 ГЕЙЛ София (US),  
 БИХАРРИ Нил (US),  
 БЕКЕТТ Пол (US),  
 ЛАНДРЕТТЕ Шон (US),  
 КОНРАД Крис (US),  
 СЮЙ Тянь (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭйАй ТЕРАПЫОТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO 2006128129 A2, 30.11.2006.  
 DOLAN DE et al. PD-1 pathway inhibitors:  
 changing the landscape of cancer immunotherapy/  
 /Cancer Control. - 2014. - V.21. - N. 3. - P.231-237.  
 RU 2350338 C2, 27.03.2009. US 20130079317 A1,  
 28.03.2013. WO 2014159745 A1, 02.10.2014. CAI  
 X et al. PIXFfive, a class III PI kinase, is the target  
 of the small molecular (см. прод.)

R U 2 7 3 8 9 3 4 C 2  
 C 1 4 3 9 6 8 3 2 7 3 4 C 2

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АПИЛИМОДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтики, а именно к способу лечения рака. Способ лечения рака включает введение субъекту композиции, содержащей апилимод или его фармацевтически приемлемую соль, в количестве, эффективном для ингибирования клеточной PIKfyve активности в раковых клетках субъекта, и введение дополнительного агента, выбранного из ингибиторов контрольной точки пути передачи

сигналов, включающей receptor запуска запрограммированной смерти 1 (PD-1) и/или его лиганды (PD-L1/2). Изобретение обеспечивает лечение рака у нуждающегося в этом субъекта за счет синергетического действия, возникающего при применении апилимода в сочетании с ингибиторами PD-1 или PD-L1/2. 16 з.п. ф-лы, 9 ил., 10 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling// Chem. Biol. - 2013. - V. 20. - N.7. - P.912-921. US 20110218138 A1, 08.09.2011. WO 2014071109 A1, 08.05.2014. BAIRD AM et al. IL-23 is pro-proliferative,

epigenetically regulated and modulated by chemotherapy in non-small cell lung cancer// Lung Cancer. - 2013.- V.79. - N.1. - P.83-90. CORONAS S. et al. Elevated levels of PtdIns5P in NPM-ALK transformed cells: implication of PIKfyve// Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2008. - V.372. - N.2. - P.351-355. RU 2421217 C2, 20.06.2011.

R U 2 7 3 8 9 3 4 C 2

R U 2 7 3 8 9 3 8 9 3 4 C 2



(51) Int. Cl.

*A61K 31/5377* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*A61K 31/5377* (2020.08); *A61K 45/06* (2020.08); *A61P 35/00* (2020.08); *A61P 35/02* (2020.08)

(21)(22) Application: 2018105923, 19.07.2016

(24) Effective date for property rights:  
19.07.2016Registration date:  
18.12.2020

Priority:

(30) Convention priority:  
20.07.2015 US 62/194,367

(43) Application published: 20.08.2019 Bull. № 23

(45) Date of publication: 18.12.2020 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 20.02.2018

(86) PCT application:  
US 2016/042905 (19.07.2016)(87) PCT publication:  
WO 2017/015262 (26.01.2017)Mail address:  
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"

(72) Inventor(s):

LIKHENSHTEJN Khenri (US),  
 ROTBERG Dzhonatan M. (US),  
 GEJL Sofiya (US),  
 BIKHARRI Nil (US),  
 BEKETT Pol (US),  
 LANDRETTTE Shon (US),  
 KONRAD Kris (US),  
 SYUJ Tyan (US)

(73) Proprietor(s):

EjAj TERAPYUTIKS, INK. (US)

R 2 7 3 8 9 3 4 C 2

R 2 7 3 8 9 3 4

## (54) METHODS OF TREATING CANCER USING APILIMOD

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a method of treating cancer. Method of treating cancer involves administering to a subject a composition comprising apilimod or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in an amount effective for inhibiting cellular PIKfyve activity in the individual's cancer cells, and administering an additional agent selected from

signaling point control point inhibitors, including a trigger for programmed death of 1 (PD-1) and/or its ligands (PD-L1/2).

EFFECT: invention provides treating cancer in a subject in need thereof by synergistic action occurring when using apilimod in combination with PD-1 or PD-L1/2 inhibitors.

17 cl, 9 dwg, 10 tbl, 7 ex

**РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА**

Для данной заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США с регистрационным № 62/194367, поданной 20 июля 2015 года, содержание которой полностью включено в данное описание посредством ссылки.

**5 ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим апилимод, и к способам их применения.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Апилимод, также называемый STA-5326, в дальнейшем «апилимод», расценивается как сильный ингибитор транскрипции IL-12 и IL-23. Смотрите, например, Wada *et al.* *Blood* 109 (2007): 1156-1164. IL-12 и IL-23 являются воспалительными цитокинами, обычно продуцируемыми иммунными клетками, такими как В-клетки и макрофаги, в ответ на антигенную стимуляцию. Аутоиммунные нарушения и другие нарушения, характеризующиеся хроническим воспалением, частично характеризуются несоответствующей продукцией этих цитокинов. Недавно было показано, что в иммунных клетках промежуточным звеном в селективном ингибировании транскрипции IL-12/IL-23 апилимодом является непосредственное связывание апилимода с фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназой (PIKfyve). Смотрите, например, Cai *et al.* *Chemistry and Biol.* 20 (2013):912-921. PIKfyve играет роль в передаче сигналов от Toll-подобных рецепторов, что важно для врожденного иммунитета.

Исходя из активности апилимода в качестве иммуномодулирующего агента и специфического ингибитора IL-12/IL-23, он был намечен в качестве применимого при лечении аутоиммунных и воспалительных заболеваний и нарушений. Смотрите, например, патенты США с №№ 6858606 и 6660733 (описывающие семейство 25 пиримидиновых соединений, в том числе апилимод, предположительно применимых для лечения заболеваний и нарушений, характеризующихся сверхпродукцией IL-12 или IL-23, таких как ревматоидный артрит, сепсис, болезнь Крона, рассеянный склероз, псориаз или инсулинов зависимый сахарный диабет). Было также выдвинуто в качестве предложения, исходя из ингибирующей с-Rel или IL-12/23 активности апилимода, что 30 он применим для лечения некоторых видов рака, особенно при раковых заболеваниях, в случае которых эти цитокины, как полагали, играют роль в поддержке аберрантной пролиферации клеток. Смотрите, например, WO 2006/128129 и Baird *et al.*, *Frontiers in Oncology* 3: 1 (2013, соответственно).

Каждое из трех клинических испытаний апилимода было сфокусировано на его 35 потенциальной эффективности при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Испытания проводились на пациентах с псориазом, ревматоидным артритом и болезнью Крона. Открытое клиническое исследование на пациентах с псориазом показало, что пероральное введение апилимода проявляет иммуномодулирующую активность, поддерживая ингибирование синтеза IL-12/IL-23, для лечения воспалительных 40 заболеваний, опосредованных ТН1 и ТН17. Wada *et al.*, *PLoSOne* 7: e35069 (April 2012). Но результаты контролируемых исследований при ревматоидном артите и болезни Крона не подтвердили того, что ингибирование IL-12/IL-23 апилимодом приводит к 45 клиническому улучшению любого из этих показаний к применению. В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом испытании фазы II апилимода на пациентах с ревматоидным артритом (RA) апилимод не изменял экспрессию IL-12 и IL-23 в синовиальной жидкости. Krauz *et al.*, *Arthritis & Rheumatism* 64:1750-1755 (2012). Авторы пришли к выводу, что «результаты не подтверждают того, что ингибирование IL-12/IL-23 апилимодом способно вызвать устойчивое клиническое

улучшение RA». Так же, рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое испытание апилимода для лечения активной болезни Крона привело к выводу, что, хотя апилимод хорошо переносится, он не демонстрирует эффективность по сравнению с плацебо *Sands et al Inflamm Bowel Dis. 2010 Jul;16(7):1209-18.*

5 Путь с участием мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) является важным путем передачи сигналов в клетках, который участвует во множестве физиологических функций, в том числе росте клеток, пролиферации клеток, метаболизме, синтезе белков и аутофагии (La Plante et al *Cell* 2012, [149](2), pp.274-293). mTOR представляет собой киназу, которая интегрирует внутриклеточные и экстраклеточные сигналы, которые 10 сообщают об уровнях аминокислот, стресса, кислорода, энергии и факторов роста, и регулирует клеточный ответ на эти сигналы окружающей среды. Было показано, что deregулирование mTOR вовлечено в широкий ряд нарушений и заболеваний, в том числе рак, ожирение, диабет и нейродегенерацию. Некоторые компоненты пути с 15 участием mTOR были исследованы в качестве мишеней лекарственных средств для лечения некоторых из этих заболеваний. Однако терапевтическая эффективность была ограничена, например, при лечении некоторых раков, и некоторые ингибиторы mTOR, как было показано, оказывают неблагоприятный эффект на метаболизм. Гены- 20 супрессоры опухолевого роста, нарушение функции которых лежит в основе развития комплекса туберозного склероза, TSC1 и TSC2, являются негативными регуляторами mTOR.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение частично основано на неожиданном обнаружении того, что апилимод является в высокой степени цитотоксическим агентом в TSC-/ клетках. В 25 этих клетках путь с участием mTOR является конститутивно активным. Путь с участием mTOR активирован в ряде раков, и при дальнейшем скрининге более 100 линий раковых клеток апилимод проявлял антитрополиферативную активность в линиях клеток различных раков. Среди линий раковых клеток, чувствительных к апилимоду, наиболее 30 чувствительными были В-клеточные лимфомы. Но, неожиданно, дифференциальная чувствительность В-клеточных лимфом к апилимоду не коррелировала с экспрессией c-Rel, экспрессией IL-12 или экспрессией IL-23 в этих клетках. Это было неожиданным, поскольку в предыдущей работе предполагалось, что апилимод будет применен против 35 тех раков, в которых экспрессия c-Rel и/или IL-12/23 имеет решающее значение для поддержки аберрантной пролиферации клеток. Вместо этого авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что цитотоксическая активность апилимода в 40 раковых клетках обусловлена ингибированием внутриклеточного потока информации и соответствующим увеличением апоптоза. Эта активность не была предсказана исходя из иммуномодулирующей активности апилимода через ингибирование им продукции IL-12/23. Кроме того, скрининг более 450 киназ идентифицировал PIKfyve как единственную мишень для связывания с высоким сродством ( $K_d=75$  пМ) апилимода в 45 линии раковых клеток человека.

Настоящим изобретением обеспечиваются новые способы терапевтического применения апилимода при лечении рака и, в частности, для лечения В-клеточных лимфом и особенно тех, которые устойчивы к стандартным схемам химиотерапии или не поддаются лечению с их помощью (рефрактерны к ней).

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ 45 лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей апилимод, в количестве, эффективном для ингибирования клеточной PIKfyve активности в раковых клетках субъекта. В одном

варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак головного мозга, глиому, саркому, рак молочной железы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мезотелиому, аппендикулярный рак, рак мочеполовой системы, почечноклеточный

5 рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак яичников, болезнь фон Хиппеля-Линдау, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, гепатоцеллюлярный рак, рак желчного пузыря, рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, нейроэндокринную опухоль, опухоль щитовидной железы, опухоль гипофиза, опухоль

10 надпочечников, гематологическую злокачественную опухоль, лимфому или лейкоз. В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому, а в дальнейшем варианте осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

В одном варианте осуществления рак выбирают из DLBCL, фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны (MZL), CLL/SLL (хронического лимфоцитарного лейкоза/

15 мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы) и мантийноклеточной лимфомы.

В одном варианте осуществления стадию введения выполняют в течение по меньшей мере одного цикла, состоящего из по меньшей мере одного дня введения композиции, содержащей апилимод, с последующим по меньшей мере одним следующим днем без введения композиции, содержащей апилимод. В некоторых вариантах осуществления

20 стадию введения выполняют в течение 2-10 циклов или 2-5 циклов. В одном варианте осуществления цикл состоит из 1-10 непрерывных дней введения композиции с последующими 1-5 непрерывными днями без введения композиции. В другом варианте осуществления цикл состоит из 2-5 непрерывных дней введения композиции с последующими 1-2 непрерывными днями без введения композиции. В дальнейшем

25 варианте осуществления цикл состоит из 5 непрерывных дней введения композиции с последующими 2 непрерывными днями без введения композиции.

В конкретных вариантах осуществления настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения рака с использованием апилимода по схеме, которая состоит из 5 дней лечения апилимодом с последующими 2- днями без лечения в 28-дневном цикле, в течение

30 периода времени от 1 до 2 месяцев, от 1 до 3 месяцев, от 1 до 4 месяцев, от 1 до 5 месяцев, от 1 до 6 месяцев или от 6 до 12 месяцев. Другие варианты осуществления описаны ниже и более подробно ниже.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту

35 терапевтически эффективного количества содержащей апилимод композиции настоящего изобретения, при этом указанная композиция содержит апилимод, или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, клатрат, гидрат, полиморф, пролекарство, аналог или производное. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей апилимод, в количестве, эффективном для

40 ингибиования клеточной PIKfyve активности в раковых клетках субъекта. В одном варианте осуществления композиция апилимода содержит апилимод в виде свободного основания или димезилат апилимода.

В одном варианте осуществления способ, кроме того, включает введение по меньшей мере одного дополнительного активного агента субъекту. По меньшей мере одним

45 дополнительным активным агентом может быть терапевтическое средство или нетерапевтическое средство. По меньшей мере один дополнительный активный агент может вводиться в одной лекарственной форме с композицией апилимода или в лекарственной форме, отдельной от композиции апилимода. В одном варианте

осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент выбирают из группы, состоящей из алкилирующего агента, интеркалирующего агента, тубулин-связывающего агента, кортикостероида и их комбинаций.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одним дополнительным агентом

- 5 является ингибитор контрольной точки пути передачи сигналов, включающей receptor запуска запрограммированной смерти 1 (PD-1) и его лиганды (PD-L1/2). В одном варианте осуществления способ включает комбинацию агента против PD-L1 и агента против PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой агент против PD-L1, выбираемый из BMS-936559/MDX-1105 (моноклонального антитела
- 10 против PD-L1 в виде полностью человеческого, с высоким сродством, иммуноглобулина (Ig) G4), MPDL3280A (сконструированного моноклонального антитела человека, мишенью которого является PD-L1), MSB0010718C и MEDI473. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой агент против PD-1, выбираемый из CT-011/пидилизумаба, BMS-936558/MDX-1106/ниволумаба и пембролизумаба. В одном
- 15 варианте осуществления ингибитор выбирают из BMS-936559/MDX-1105, MPDL3280A, MSB0010718C, MEDI473, CT-011/пидилизумаба, BMS-936558/MDX-1106/ниволумаба и пембролизумаба, а также комбинаций двух или более любых из вышеприведенных агентов.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный

- 20 агент представляет собой терапевтическое средство, выбираемое из группы, состоящей из ибрутиниба, ритуксимаба, доксорубицина, преднизолона, винкристина, велкейда и эверолимуса и их комбинаций. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент представляет собой терапевтическое средство, выбираемое из циклофосфамида, гидроксидаунорубицина (также называемого
- 25 доксорубицином или Adriamycin<sup>TM</sup>), винкристина (также называемого Oncovin<sup>TM</sup>), преднизона, преднизолона и их комбинаций. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент представляет собой терапевтическое средство, выбираемое из группы, состоящей из BMS-936559/MDX-1105, MPDL3280A, MSB0010718C, MEDI473, CT-011/пидилизумаба, BMS-936558/MDX-1106/
- 30 ниволумаба и пембролизумаба, а также комбинаций двух или более любых из вышеприведенных агентов.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одним дополнительным активным агентом является нетерапевтическое средство. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают для уменьшения одного или более побочных

- 35 эффектов композиции апилимода. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из ондансетрона, гранисетрона, доласетрона и палоносетрона. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из пиндолола и рисперидона. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают для увеличения биодоступности
- 40 апилимода в композиции апилимода. В одном аспекте этого варианта осуществления нетерапевтическое средство представляет собой ингибитор CYP3A. В конкретном варианте осуществления ингибитор CYP3A представляет собой ритонавир или кобицистат.

В одном варианте осуществления лекарственная форма композиции апилимода

- 45 представляет собой лекарственную форму для перорального введения. В другом варианте осуществления лекарственная форма композиции апилимода подходит для внутривенного введения. В одном варианте осуществления, когда лекарственная форма подходит для внутривенного введения, введение осуществляют посредством

однократной инъекции или с помощью капельницы.

В одном варианте осуществления субъектом является являющийся человеком пациент с раком. В одном варианте осуществления являющимся человеком пациентом с раком, нуждающимся в лечении с помощью композиции апилимода настоящего изобретения, 5 является пациент, рак у которого не поддается лечению с помощью стандартной схемы химиотерапии. В одном варианте осуществления являющимся человеком пациентом с раком, нуждающимся в лечении с помощью композиции апилимода, является пациент, рак у которого рецидивировал после лечения с помощью стандартной схемы химиотерапии. В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому. В 10 одном варианте осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В одном варианте осуществления В-клеточной лимфомой является неходжкинская В-клеточная лимфома. В одном варианте осуществления неходжкинскую В-клеточную лимфому выбирают из диффузной крупно-В-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта, медиастинальной В-клеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы и 15 фолликулярной лимфомы. В одном варианте осуществления неходжкинская В-клеточная лимфома представляет собой DLBCL. В одном варианте осуществления DLBCL представляет собой подтип GCB.

В одном варианте осуществления стандартная схема химиотерапии включает одно или более терапевтических средств, выбираемых из группы, состоящей из ибрутиниба, 20 ритуксимаба, доксорубицина, преднизолона, винкристина, велкейда, циклофосфамида, дексаметазона и эверолимуса. В одном варианте осуществления стандартную схему химиотерапии выбирают из CHOP (циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, Oncovin<sup>TM</sup> (винкристин) и преднизон или преднизолон), COOP (циклофосфамид, винкристина сульфат, 25 прокарбазина гидрохлорид, преднизон), CVP (циклофосфамид, винкристина сульфат, преднизон), EPOCH (этопозид, преднизон, винкристина сульфат, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид), Hyper-CVAD (циклофосфамид, винкристина сульфат, доксорубицина гидрохлорид, дексаметазон), ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид), R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, винкристина сульфат, прокарбазина гидрохлорид, 30 преднизон) и R-CVP (ритуксимаб, циклофосфамид, винкристина сульфат, преднизон).

В одном варианте осуществления способ представляет собой способ лечения лимфомы с использованием комбинированной терапии, включающей композицию апилимода и схему химиотерапии для лечения лимфомы. В одном варианте осуществления схема химиотерапии представляет собой схему CHOP. В другом варианте осуществления схему химиотерапии выбирают из COOP, CVP, EPOCH, Hyper-CVAD, ICE, R-CHOP и 35 R-CVP. Схема может также включать одно или более дополнительных нетерапевтических средств, описанных выше, например нетерапевтическое средство, выбираемое из одного или более из ингибитора СYP3A, такого как ритонавир или кобицистат, ондансетрона, гранисетрона, доласетрона, палоносетрона, пиндолола и рисперидона.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

40 Фиг. 1А: Клетки с недостатком TSC2 очень чувствительны к апилимоду ( $IC_{50}=19,5$  нМ).

Фиг. 1В: Эффект апилимода на жизнеспособность раковых клеток по сравнению с 45 нераковыми (нормальными) клетками.

Фиг. 2А: Построенная по десяти точкам зависимость от дозы ответа клеток колоректального рака HCT116 на апилимод на 3, 5 и 7 день инкубации с соединением.

Фиг. 2В: Чувствительность различных подтипов NHL к апилимоду в 7-дневном анализе ( $IC_{50} < 125$  нМ).

Фиг. 3: Скрининг клеток SU-DHL-4 с использованием подобранной вручную библиотекой из 93 лекарственных средств с апилимодом (10 нМ) и без него идентифицировал ибрутиниб как лекарственное средство, которое в комбинации с апилимодом проявляет синергетическую активность.

5 Фиг. 4: Апилимод ингибитирует рост опухолей DLBCL, возникших в результате ксенотрансплантации клеток SU-DHL-6; Верхняя линия показывает физиологический раствор в качестве носителя (ромб, светло-серые сплошные линии) раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 внутривенно; 0,5% метилцеллюлоза (треугольник, сплошные темно-серые линии) раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 перорально; димезилат 10 апилимода (квадрат, пунктирные линии) 67,5 мг/кг (свободное основание 47 мг/кг) раз в день x5 внутривенно, 2 дня без лечения, раз в день x5; апилимод в виде свободного основания (квадрат, светло-серые сплошные линии) 150 мг/кг раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 перорально; апилимод в виде свободного основания (крест, сплошные линии) 75 мг/кг два раза в день x5, 2 дня без лечения, ТР КТХТЫВЗ, два раза 15 в день x5 перорально.

Фиг. 5: Противоопухолевая активность апилимода в комбинации с ибрутинибом по отношению к опухолям DLBCL опухоли *in vivo*; Верхняя линия показывает носитель (ромб, светло-серые сплошные линии) раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 перорально+внутривенно; ибрутиниб (треугольник, сплошные темно-серые линии) 10 20 мг/кг раз в день x12 внутривенно; апилимод в виде свободного основания (квадрат, пунктирные линии) 75 мг/кг раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 перорально; ибрутиниб (крест, сплошная темная линия) 20 мг/кг раз в день x12 внутривенно; апилимод в виде свободного основания 75 мг/кг раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в 25 день x5 перорально+ибрутиниб 10 мг/кг раз в день x12 внутривенно (квадрат, сплошные светло-серые линии); апилимод в виде свободного основания 75 мг/кг раз в день x5, 2 дня без лечения, раз в день x5 перорально+ибрутиниб 10 мг/кг раз в день x12 внутривенно (круг, сплошные умеренно серые линии).

Фиг. 6: Апилимод связывается с высоким сродством с PIKfyve (Kd=75 пМ).

Фиг. 7: Экспрессия IL-23 не является статистически значимым прогностическим 30 фактором чувствительности в случае неходжкинской В-клеточной лимфомы. Показаны чувствительные к апилимоду линии клеток NHB (нижние, темные) и нечувствительные к нему (верхние, светлые).

Фиг. 8А: Иммуноокрашивание фосфоинозитида PI(3,5)P<sub>2</sub> в клетках нейроглиомы H4, подвергнутых обработке указанной концентрацией апилимода в течение 24 часов.

35 Фиг. 8В: Изображения дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (DIC) клеток нейроглиомы H4, подвергнутых обработке либо носителем (слева), либо 100 нМ апилимодом (справа) в течение 24 часов.

Фиг. 9А: Слева: изображения DIC клеток H4, трансдуцированных либо короткой 40 шпилечной РНК без определенной мишени (контроль), либо кшРНК, мишенью которой является PIKFYVE (кшРНК с PIKFYVE в качестве мишени). Справа: жизнеспособность клеток H4 после доксициклином либо контрольной кшРНК, либо кшРНК, мишенью которой является PIKFYVE.

Фиг. 9В: Выключение гена PIKFYVE в нейроглиоме H4.

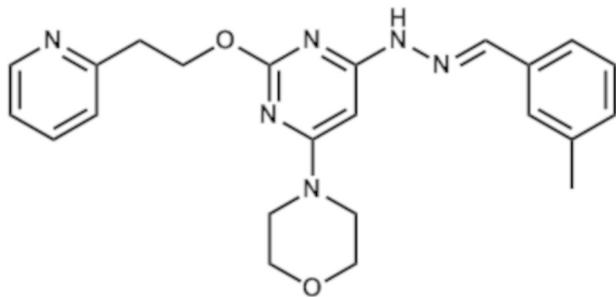
#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

45 Настоящим изобретением обеспечиваются композиции и способы, связанные с применением апилимода для лечения рака у субъекта, предпочтительно являющегося человеком субъекта, нуждающегося в таком лечении. Настоящее изобретение в целом относится к новым применением апилимода, основанным на неожиданном открытии

цитотоксической активности апилимода в отношении ряда раковых клеток как лимфоидного, так и нелимфоидного происхождения, активности, которая не является явно связанной с, или предсказуемой из, известной иммуномодулирующей и ингибирующей IL-12/23 активности апилимода. Кроме того, настоящим изобретением 5 обеспечиваются новые терапевтические подходы к лечению рака на основе терапевтических схем, в которых используется апилимод или отдельно, в качестве монотерапии, или в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, таким как дополнительное противораковое (химиотерапевтическое) средство. В терапевтических схемах, описанных здесь, 10 используется селективная цитотоксическая активность апилимода в отношении раковых клеток по сравнению с нераковыми (нормальными) клетками, а также увеличенная чувствительность раковых клеток к апилимоду, вводимому в течение определенного периода времени.

Используемый здесь термин «композиция апилимода» может относиться к

15 композиции, включающей сам апилимод (свободное основание) или может включать фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, гидраты, полиморфы, пролекарства, аналоги или производные апилимода, описанные ниже. Структура апилимода представлена формулой I:



Химическим названием апилимода является 2-[2-пиридин-2-ил)-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)-пириимидин (название IUPAC: (E)-4-(6-(2-(3-метилбензилиден) гидразинил)-2-(2-(пиридин-2-ил)этокси)пириимидин-4-ил)морфолин), и номер CAS - 541550-19-0.

30 Апилимод может быть получен, например, в соответствии со способами, описанными в патентах США №№ 7923557 и 7863270 и WO 2006/128129.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемая соль» представляет собой соль, образованную, например, из кислоты и основной группы композиции 35 апилимода. Иллюстративные соли включают, но без ограничения ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислую соль лимонной кислоты, тарtrат, олеат, тантат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, бензилат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкаронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, 40 этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (например, 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). В предпочтительном варианте осуществления соль апилимода включает метансульфонат.

45 Термин «фармацевтически приемлемая соль» также относится к соли, полученной из композиции апилимода, имеющей кислотную функциональную группу, такую как карбоксильная функциональная группа, и фармацевтически приемлемого неорганического или органического основания.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» также относится к соли, полученной из композиции апилимода, имеющей основную функциональную группу, такую как

функциональная аминогруппа, и фармацевтически приемлемой неорганической или органической кислоты.

Соли описанных здесь соединений могут быть синтезированы исходя из исходного соединения с помощью обычных химических способов, таких как способы, описанные в Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Hemrich Stalil (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, August 2002. Как правило, такие соли могут быть получены путем осуществления реакции исходного соединения с соответствующей кислотой в воде или в органическом растворителе или в смеси и того, и другого.

Одна солевая форма описанного здесь соединения может быть превращена в свободное основание и необязательно в другую форму соли способами, хорошо известными квалифицированному специалисту. Например, свободное основание может быть образовано путем пропускания раствора соли через колонку, содержащую аминосодержащую неподвижную фазу (например, Strata-NH<sub>2</sub> колонку). Альтернативно, раствор соли в воде может быть обработан бикарбонатом натрия для разложения соли и осаждения свободного основания. Затем свободное основание может быть объединено с другой кислотой, используя обычные способы.

Используемый здесь термин «полиморф» означает твердые кристаллические формы соединения настоящего изобретения (например, 2-[2-пиридин-2-ил]этокси]-4-N'-(3-метил-бензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)пиrimидин) или его комплекс.

Различные полиморфы того же соединения могут обладать различными физическими, химическими и/или спектроскопическими свойствами. Различные физические свойства включают, но без ограничения ими, устойчивость (например, к нагреванию или свету), сжимаемость и плотность (что важно при приготовлении лекарственного средства и производстве продукта) и скорости растворения (которые могут влиять на биодоступность). Различия в устойчивости могут быть результатом изменений химической реактивности (например, дифференциального окисления, так что лекарственная форма быстрее обесцвечивается, когда она состоит из одного полиморфа, чем когда она состоит из другого полиморфа) или механических характеристик (например, таблетки разрушаются при хранении, поскольку кинетически предпочтительный полиморф превращается в термодинамически более стабильный полиморф) или и того, и другого (например, таблетки одного полиморфа более подвержены разрушению при высокой влажности). Различные физические свойства полиморфов могут влиять на технологический процесс с их использованием. Например, один полиморф может с большей вероятностью образовывать сольваты или может быть сложнее отфильтровать или отмывать от примесей, чем другие, например, из-за формы или распределения по размеру его частиц.

Используемый здесь термин «гидрат» означает соединение настоящего изобретения (например, 2-[2-пиридин-2-ил]-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)пиrimидин) или его соль, которая, кроме того, включает стехиометрическое или нестехиометрическое количество воды, связанной нековалентными межмолекулярными силами.

Используемый здесь термин «клатрат» означает соединение настоящего изобретения (например, 2-[2-пиридин-2-ил]-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)пиrimидин) или его соль в виде кристаллической решетки, которая содержит пространства (например, каналы), которые содержат гостевую молекулу (например, растворитель или воду), захваченную внутрь.

Используемый здесь термин «пролекарство» означает производное описанного здесь соединения (например, 2-[2-пиридин-2-ил]-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]

-6-(морфолин-4-ил)пиrimидина), которое может подвергаться гидролизу, окислению или иным образом реагировать в биологических условиях (in vitro или in vivo) с обеспечением соединения настоящего изобретения. Пролекарства могут только активироваться при такой реакции в биологических условиях или могут обладать 5 активностью в их непрореагировавших формах. Примеры пролекарств, предполагаемых в этом изобретении, включают, но без ограничения ими, аналоги или производные описанного здесь соединения (например, 2-[2-пиридин-2-ил]-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)пиrimидина), которые содержат биогидролизуемые части, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые 10 сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые фосфатные аналоги. Другие примеры пролекарств включают производные соединений любой из приведенных здесь формул, которые содержат части -NO, -NO<sub>2</sub>, -ONO или -ONO<sub>2</sub>. Пролекарства могут, как правило, 15 быть получены, используя хорошо известные способы, такие как способы, описанные в Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed.).

Используемый здесь термин «сольват» или «фармацевтически приемлемый сольват» представляет собой сольват, образованный в результате ассоциации одной или более 20 молекул растворителя с одним из соединений, описанных здесь (например, 2-[2-пиридин-2-ил]-этокси]-4-N'-(3-метилбензилиден)-гидразино]-6-(морфолин-4-ил)пиrimидином). Термин сольват включает гидраты (например, гемигидрат, моногидрат, дигидрат, 25 тригидрат, тетрагидрат и т.п.).

Используемый здесь термин «аналог» относится к химическому соединению, которое структурно схоже с другим, но немного отличается по составу (как в случае замены 30 одного атома атомом другого элемента или в случае присутствия конкретной функциональной группы, или в случае замены одной функциональной группы другой функциональной группой). Таким образом, аналогом является соединение, которое схоже или сравнимо по функции и внешнему виду, но не по структуре или по происхождению с эталонным соединением. Используемый здесь термин «производное» относится к соединениям, которые имеют общую сердцевинную структуру и замещены 35 различными группами, как описано здесь.

### Способы лечения

Настоящим изобретением обеспечиваются способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтически эффективного 35 количества композиции апилимода настоящего изобретения, при этом указанная композиция содержит апилимод или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, клатрат, гидрат, полиморф, пролекарство, аналог или производное. В одном варианте осуществления композиция апилимода содержит апилимод в виде свободного основания или димезилат апилимода. Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается 40 применение композиции апилимода для приготовления лекарственного средства, применимого для лечения рака.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак головного мозга, глиому, саркому, рак молочной железы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мезотелиому, аппендикулярный рак, рак мочеполовой системы, почечноклеточный 45 рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак яичников, болезнь фон Хиппеля-Линдау, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, гепатоцеллюлярный рак, рак желчного пузыря, рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак поджелудочной железы,

нейроэндокринную опухоль, опухоль щитовидной железы, опухоль гипофиза, опухоль надпочечников, гематологическую злокачественную опухоль, лимфому или лейкоз.

В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому. В одном варианте осуществления лимфомой является В-клеточная лимфома. В одном варианте

- 5 осуществления В-клеточную лимфому выбирают из группы, состоящей из В-клеточной лимфомы Ходжкина и неходжкинской В-клеточной лимфомы. В одном варианте осуществления В-клеточной лимфомой является неходжкинская В-клеточная лимфома, выбираемая из группы, состоящей из DLBCL, фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны (MZL) или лимфомы из лимфатической ткани, связанной со
- 10 слизистой оболочкой (MALT), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (которая перекрывается с хроническим лимфоцитарным лейкозом) и мантийноклеточной лимфомы. В одном варианте осуществления В-клеточной лимфомой является неходжкинская В-клеточная лимфома, выбираемая из группы, состоящей из лимфомы Беркитта, лимфомы Беркитта, первичной медиастинальной (тимусной) крупно-В-
- 15 клеточной лимфомы, лимфоплазмоцитарной, которая может проявляться в виде макроглобулинемии Вальденстрема, В-клеточной лимфомы из В-клеток маргинальной зоны лимфатического узла (SMZL), лимфомы маргинальной зоны селезенки (SMZL), внутрисосудистой крупно-В-клеточной лимфомы, первичной выпотной лимфомы, лимфоматоидного гранулематоза, крупно-В-клеточной лимфомы с большим
- 20 содержанием Т-клеток/гистиоцитов, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной кожной диффузной крупно-В-клеточной лимфомы, типа нижних конечностей (первичной кожной DLBCL, типа нижних конечностей), EBV-позитивной диффузной крупно-В-клеточной лимфомы пожилых людей, диффузной крупно-В-клеточной лимфомы, связанной с воспалением, внутрисосудистой крупно-В-клеточной лимфомы,
- 25 ALK-позитивной крупно-В-клеточной лимфомы и плазмобластной лимфомы.

В одном варианте рак представляет собой лимфому, выбираемую из DLBCL, фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны (MZL), CLL/SLL (хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы) и мантийноклеточной лимфомы.

- 30 В одном варианте осуществления способ представляет собой терапевтическую схему для лечения неходжкинской лимфомы (NHL) у субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту суточного количества композиции апилимода, эффективного для ингибиования клеточной PIKfyve активности в раковых клетках субъекта. В одном варианте осуществления композицию апилимода
- 35 вводят по схеме, которая состоит из по меньшей мере одного дня введения композиции, содержащей апилимод, с последующим по меньшей мере одним следующим днем без введения композиции, содержащей апилимод. В одном варианте осуществления стадию введения выполняют в течение 2-10 циклов или 2-5 циклов. В одном варианте осуществления цикл состоит из 1-10 непрерывных дней введения композиции с
- 40 последующими 1-5 непрерывными днями без введения композиции. В одном варианте осуществления цикл состоит из 2-5 непрерывных дней введения композиции с последующими 1-2 непрерывными днями без введения композиции. В одном варианте осуществления цикл состоит из 5 непрерывных дней введения композиции с последующими 2 непрерывными днями без введения композиции.

- 45 В одном варианте осуществления способ включает или состоит из 5 дней лечения апилимодом с последующим 2-днями без лечения в 28-дневном цикле в течение периода времени, колеблющегося от 1 до 2 месяцев, от 1 до 3 месяцев, от 1 до 4 месяцев, от 1 до 5 месяцев, от 1 до 6 месяцев или от 6 до 12 месяцев.

В соответствии с любым из этих вариантов осуществления композиция апилимода может содержать апилимод в виде свободного основания или димезилат апилимода. В одном варианте осуществления NHL представляет собой фолликулярную лимфому. В одном варианте осуществления NHL представляет собой мантийноклеточную лимфому. В одном варианте осуществления NHL представляет собой лимфому Беркитта. В одном варианте осуществления NHL представляет собой диффузную крупно-В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта, медиастинальную В-клеточную лимфому или мантийноклеточную лимфому. В одном варианте осуществления NHL представляет собой DLBCL. В одном варианте осуществления DLBCL является рефрактерной. В одном варианте осуществления рефрактерной DLBCL является DLBCL-ABC или DLBCL-GCB. В одном варианте осуществления рефрактерная DLBCL содержит двойную *mus/bcl2* транслокацию («DLBCL с двойным поражением»). В одном варианте осуществления DLBCL не поддается лечению с помощью стандартной схемы CHOP.

#### Комбинированная терапия

Настоящим изобретением также обеспечиваются способы, включающие комбинированную терапию. Используемый здесь термин «комбинированная терапия» или «совместная терапия» включает введение терапевтически эффективного количества композиции апилимода с по меньшей мере одним дополнительным активным агентом, в качестве части конкретной схемы лечения, предназначенной для обеспечения положительного эффекта от совместного действия композиции апилимода и дополнительного активного агента. «Комбинированная терапия», как предполагается, не охватывает введение двух или более терапевтических соединений в качестве части отдельных схем монотерапии, которые случайно и произвольно приводят к положительному эффекту, который не предполагался или не предсказывался.

В одном варианте осуществления способ представляет собой способ лечения рака с использованием комбинированной терапии, включающей композицию апилимода и схему химиотерапии для лечения рака. В одном варианте осуществления схемой химиотерапии является схема CHOP. CHOP относится к схеме, обычно используемой при лечении неходжкинской лимфомы, состоящей из следующих активных агентов: (С) циклофосфамида, алкилирующего агента, который повреждает ДНК путем связывания с ней и вызова образования поперечных связей; (Н) гидроксидаунорубицина (также называемого доксорубицином или Адриамицином), интеркалирующего агента, который повреждает ДНК в результате его вставки между основаниями ДНК; (О) онковина (винкристина), который предотвращает деление клеток в результате связывания с белком тубулином; и (Р) преднизон или (Р) преднизолон, которые являются кортикостероидами. В другом варианте осуществления схему химиотерапии выбирают из COOP (циклофосфамид, винкристина сульфат, прокарбазина гидрохлорид, преднизон), CVP (циклофосфамид, винкристина сульфат, преднизон), EPOCH (этопозид, преднизон, винкристина сульфат, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид), Hyper-CVAD (циклофосфамид, винкристина сульфат, доксорубицина гидрохлорид, дексаметазон), ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид), R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, винкристина сульфат, прокарбазина гидрохлорид, преднизон) и R-CVP (ритуксимаб, циклофосфамид, винкристина сульфат, преднизон).

По меньшей мере одним дополнительным активным агентом может быть терапевтическое средство, например противораковое средство или химиотерапевтическое средство от рака, или нетерапевтическое средство, и их комбинации. Что касается терапевтических агентов, положительный эффект комбинации включает, но без ограничения ими, фармакокинетическое или фармакодинамическое

совместное действие, возникающее в результате объединения терапевтически активных соединений. Что касается нетерапевтических средств, положительный эффект комбинации может относиться к уменьшению токсичности, побочного эффекта или неблагоприятного явления, связанного с терапевтически активным агентом в комбинации.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой нетерапевтическое средство, которое смягчает один или более побочных эффектов композиции апилимода, один или более побочных эффектов, выбираемых из любого из тошноты, рвоты, головной боли, головокружения, тумана в голове, сонливости и стресса. В одном аспекте этого варианта осуществления нетерапевтическим средством является антагонист серотонинового рецептора, также известного как 5-гидрокситриптаминовые рецепторы или 5-HT-рецепторы. В одном аспекте нетерапевтическим средством является антагонист 5-HT<sub>3</sub>- или 5-HT<sub>1a</sub>-рецептора.

В одном аспекте нетерапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из ондансетрона, гранисетрона, доласетрона и палоносетрона. В другом аспекте нетерапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из пиндолола и рисперидона.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одним дополнительным агентом является терапевтическое средство. В одном варианте осуществления терапевтическим 20 средством является противораковое средство. В одном варианте осуществления противораковым средством является ибрутиниб. В одном варианте осуществления композицию апилимода вводят вместе с ибрутинибом в одной лекарственной форме или в отдельных лекарственных формах. В одном варианте осуществления лекарственная форма представляет собой лекарственную форму для перорального введения. В другом варианте осуществления лекарственная форма подходит для внутривенного введения.

В одном варианте осуществления противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое разрешено для применения при лечении лимфомы. Неограничивающие примеры таких лекарственных средств включают абитрексат (метотрексат), адцетрис (брентуксимаб-ведотин), амбохлорин (хлорамбуцил), 30 амбоклорин (хлорамбуцил), арранон (неларабин), бекенум (кармустин), белеодак (белиностат), белиностат, гидрохлорид бендамустина, бексар (тозитумомаб и <sup>131</sup>I-тозитумомаб), BiCNU (кармустин), бленоксан (блеомицин), блеомицин, бортезомиб, брентуксимаб-ведотин, кармубрис (кармустин), кармустин, хлорамбуцил, клафен (циклофосфамид), циклофосфамид, цитоксан (циклофосфамид), дениллейкин дифтитокс, 35 DeroCyt (липосомальный цитарабин), доксорубицина гидрохлорид, фолекс (метотрексат), фолотин (празатрексат), ибритумомаб тиуксетан, ибрутиниб, идеалисисб, имбрувику (ибрутиниб), инtron A (рекомбинантный интерферон Альфа-2b), истодакс (ромидепсин), леналидомид, лейкеран (хлорамбуцил), линфолизин (хлорамбуцил), липосомальный цитарабин, мехлоретамина гидрохлорид, метотрексат, метотрексат LPF (метотрексат), 40 мексат (метотрексат), мексат-AQ (метотрексат), мозобил (периксафор), азотистый иприт (мехлоретамина гидрохлорид), неларабин, неосар (циклофосфамид), онтак (дениллейкин-дифтитокс), периксафор, пралатрексат, преднизон, рекомбинантный интерферон Альфа-2b, ревлимид (леналидомид), ритуксан (ритуксимаб), ритуксимаб, ромидепсин, 45 тозитумомаб и <sup>131</sup>I-тозитумомаб, треанду (гидрохлорид бендамустина), велбан (винбластина сульфат), велкейд (бортезомиб), вельсар (винбластина сульфат), винбластина сульфат, винкасар PFS (винкристина сульфат), винкристина сульфат, вориностат, зевалин (ибритумомаб тиуксетан), золинзу (вориностат) и зиделиг

(идализиб).

В одном варианте осуществления противораковое средство выбирают из ингибитора EZH2, например, EPZ-6438. В одном варианте осуществления противораковое средство выбирают из таксола, винкристина, доксорубицина, темсиролимуса, карбоплатина, офатумумаба, ритуксимаба и их комбинаций.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой ингибитор пути с участием В-клеточного рецептора. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути с участием В-клеточного рецептора представляет собой ингибитор CD79A, ингибитор CD79B, ингибитор CD19, ингибитор

10 Lyn, ингибитор Syk, ингибитор PI3K, ингибитор Blnk, ингибитор PLC $\gamma$ , ингибитор PKC $\gamma$  или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой антитело, ингибитор передачи сигналов от В-клеточного рецептора, ингибитор PI3K, ингибитор IAP, ингибитор mTOR, радиоиммунотерапевтический агент, повреждающий ДНК агент, ингибитор протеосом, 15 ингибитор гистондеацетилазы, ингибитор протеинкиназы, ингибитор белка хеджехога, ингибитор Hsp90, ингибитор теломеразы, ингибитор Jak1/2, ингибитор протеазы, ингибитор РКС, ингибитор PARP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент выбирают из хлорамбуцила, ифосфамида, доксорубицина, месалазина, талидомида, 20 леналидомида, темсиролимуса, эверолимуса, флударабина, фостаматиниба, паклитаксела, доцетаксела, офатумумаба, ритуксимаба, дексаметазона, преднизона, CAL-101, ибритумомаба, тозитумомаба, бортезомиба, пентостатина, эндостатин или их комбинации.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент 25 представляет собой моноклональное антитело, такое как, например, алемтузумаб, бевацизумаб, катумаксомаб, цетуксимаб, эдреколомаб, гемтузумаб, офатумумаб, панитумумаб, ритуксимаб, трастузумаб, экулизумаб, эфализумаб, муромаб-CD3, натализумаб, адалимумаб, афелимомаб, цертолизумаб пэгол, голимумаб, инфликсимаб, базиликсимаб, канакинумаб, даклизумаб, меполизумаб, тоцилизумаб, устекинумаб, 30 ибритумомаб тиуксетан, тозитумомаб, абаговомаб, адекатумумаб, алемтузумаб, направленное против CD30 моноклональное антитело Xmab2513, направленное против МЕТ моноклональное антитело MetMab, аполизумаб, апомаб, арцитумомаб, базиликсимаб, биспецифическое антитело 2B1, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, капромаб пендетид, циксутумумаб, клаудиксимаб, конатумумаб, дацетузумаб, 35 деносумаб, экулизумаб, эпратузумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, фигитумумаб, фрезолимумаб, галиксимаб, ганитумаб, гемтузумаб озогамицин, глембатумумаб, ибритумомаб, инотузумаб озогамицин, ипилимумаб, лексатумумаб, линтузумаб, линтузумаб, лукатумумаб, мапатумумаб, матузумаб, милатузумаб, моноклональное антитело CC49, нецитумумаб, нимотузумаб, офатумумаб, ореговомаб, пертузумаб, 40 рамакуримаб, ранибизумаб, сиплизумаб, сонепцизумаб, танезумаб, тозитумомаб, трастузумаб, тремелимумаб, тукотузумаб цемолейкин, велтузумаб, висилизумаб, волоциксимаб и залутумумаб.

Применительно к комбинированной терапии введение композиции апилимода и 45 введении одного или более дополнительных активных агентов могут быть одновременными или последовательными. В другом варианте осуществления введение различных компонентов комбинированной терапии может осуществляться с различными частотами. Один или более дополнительных агентов могут вводиться (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48

часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) до введения соединения настоящего изобретения, одновременно с ним или после него (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель).

Один или более дополнительных активных агентов могут быть составлены для совместного введения с композицией апилимода в одну лекарственную форму, как описано более подробно здесь. Один или более дополнительных активных агентов могут вводиться отдельно от лекарственной формы, которая включает соединение настоящего изобретения. Когда дополнительный активный агент вводят отдельно от композиции апилимода, это может осуществляться таким же способом введения, как и введение композиции апилимода, или отличным от него способом.

Предпочтительно введение композиции апилимода в комбинации с одним или более дополнительными агентами дает синергетическую реакцию у субъекта, подвергаемого лечению. В этом контексте термин «синергетическая» относится к эффективности комбинации, которая более эффективна, чем аддитивные эффекты только одной из двух терапий. Синергетический эффект комбинированной терапии в соответствии с настоящим изобретением может позволить использовать более низкие дозы и/или менее частое введение по меньшей мере одного агента в комбинации по сравнению с его дозой и/или частотой вне комбинации. Дополнительные положительные эффекты комбинация могут проявляться в предотвращении или уменьшении неблагоприятных или нежелательных побочных эффектов, связанных с использованием только одной из двух терапий в комбинации (также называемой монотерапией).

«Комбинированная терапия» также включает введение соединений настоящего изобретения в добавочной комбинации с немедикаментозными терапиями (например, хирургическим вмешательством или лучевой терапией). В тех случаях, когда комбинированная терапия, кроме того, включает немедикаментозное лечение, немедикаментозное лечение может проводиться в любое подходящее время до тех пор, пока положительный эффект от совместного действия комбинации терапевтических соединений и немедикаментозного лечения не будет достигнут. Например, в соответствующих случаях положительный эффект все еще достигается, когда немедикаментозное лечение временно освобождают от введения терапевтических соединений, возможно, на несколько дней или даже недель.

Немедикаментозное лечение может быть выбрано из химиотерапии, лучевой терапии, гормональной терапии, антиэстрогенной терапии, генной терапии и хирургического вмешательства. Например, немедикаментозная терапия представляет собой удаление яичника (например, для снижения уровня эстрогена в организме), торацентез (например, для удаления жидкости из грудной клетки), парацентез (например, для удаления жидкости из брюшной полости), операцию по удалению или уменьшению ангиомиолипом, трансплантации легкого (и, необязательно, с антибиотиком для предотвращения инфекции вследствие трансплантации) или кислородную терапию (например, через носовую канюлю, содержащую две маленькие пластиковые трубочки, или канюли, которые помещаются в обе ноздри, с использованием маски для лица, которая размещается поверх носа и рта, или через маленькую трубочку, вставленную в трахею через переднюю часть шеи, также называемую транстрахеальной кислородной терапией).

Применительно к описанным здесь способам, количество композиции апилимода, вводимой субъекту, является терапевтически эффективным количеством. Термин

«терапевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для лечения, уменьшения интенсивности симптома, уменьшения тяжести или сокращения длительности заболевания или нарушения, подвергаемого лечению, или увеличения или улучшения терапевтического эффекта другой терапии, или достаточному для

5 проявления выявляемого терапевтического эффекта у субъекта. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество композиции апилимода представляет собой количество, эффективное для ингибирования PIKfyve киназной активности.

Эффективное количество композиции апилимода может колебаться от

10 приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 250 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг; или представлять собой любой диапазон, в котором нижний предел диапазона составляет любое количество между 0,001 мг/кг и 900 мг/кг, а верхний предел диапазона составляет любое количество 15 между 0,1 мг/кг и 1000 мг/кг (например, между 0,005 мг/кг и 200 мг/кг, между 0,5 мг/кг и 20 мг/кг). Эффективные дозы также будут меняться, как это понятно специалистам в данной области техники, в зависимости от подвергаемых лечению заболеваний, способа введения, использования наполнителей и возможности совместного 20 использования с другими терапевтическими лечениими, такими как использование других агентов. Смотрите, например, патент США с № 7863270, включенный сюда посредством ссылки.

В более конкретных аспектах композицию апилимода вводят в соответствии со схемой введения доз 30-1000 мг/день (например, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 или 300 мг/день) в течение по меньшей 25 мере 1 недели (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 36, 48 и более недель).

Предпочтительно, когда композицию апилимода вводят в соответствии со схемой введения доз 100-1000 мг/день в течение 4 или 16 недель. Альтернативно или впоследствии, композицию апилимода вводят в соответствии со схемой введения доз 100 мг-300 мг два раза в день в течение 8 недель или, необязательно, в течение 52 недель. 30 Альтернативно или впоследствии, композицию апилимода вводят в соответствии со схемой введения доз 50 мг-1000 мг два раза в день в течение 8 недель или, необязательно, в течение 52 недель.

Эффективное количество композиции апилимода может вводиться один раз в день или два раза в день, или от двух до пяти раз в день, до двух раз или до трех раз в день, 35 или до восьми раз в день. В одном варианте осуществления композицию апилимода вводят три раза в день, два раза в день, один раз в день на протяжении четырнадцати дней (четыре раза в день, три раза в день или два раза в день или один раз в день) и не вводят на протяжении 7 дней в 3-недельном цикле, вводят на протяжении до пяти или семи дней (четыре раза в день, три раза в день или два раза в день, или один раз в день) 40 и не вводят на протяжении 14-16 дней в 3-недельном цикле, или вводят один раз в два дня, или один раз в неделю, или раз в 2 недели или раз в 3 недели.

В одном варианте осуществления композицию апилимода вводят один или два раза в день на протяжении 5 дней, не вводят на протяжении 2 дней в 28-дневном цикле в течение периода времени, который составляет от 1-2 месяцев, от 1-3 месяцев, от 1-4 45 месяцев, от 1-5 месяцев, от 1-6 месяцев или от 6-12 месяцев.

В соответствии с описанными здесь способами «субъектом, нуждающимся в лечении», является субъект, имеющий заболевание, нарушение или состояние, или субъект, подверженный повышенному риску развития заболевания, нарушения или состояния,

по сравнению с популяцией в целом. Субъектом, нуждающимся в этом, может быть субъект, который является «не отвечающим» на доступную в настоящее время терапию для заболевания или нарушения, например рака, или «рефрактерным» к ней. В этом контексте термины «не отвечающий» и «рефрактерный» относятся к ответу субъекта на терапию, который не является клинически соответствующим для облегчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением. В одном аспекте способов, описанных здесь, субъектом, нуждающимся в этом, является субъект с раком, рак у которого является рефрактерным к стандартной терапии, или рак у которого рецидивировал после стандартного лечения.

«Субъект» включает млекопитающее. Млекопитающим может быть, например, любое млекопитающее, например человек, примат, позвоночное животное, птица, мышь, крыса, домашняя птица, собака, кошка, корова, лошадь, коза, верблюд, овца или свинья. Предпочтительно млекопитающим является человек. Термин «пациент» относится к являющемуся человеком субъекту.

Настоящим изобретением также обеспечивается монотерапия для лечения заболевания, нарушения или состояния, как здесь описано. Используемый здесь термин «монотерапия» относится к введению одного активного или терапевтического соединения субъекту, нуждающемуся в этом.

Как здесь используется, «лечение» или «лечить» описывает тактику лечения пациента и наблюдение врача за ним с целью борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением и включает введение композиции апилимода для облегчения интенсивности симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения, или для устранения заболевания, состояния или нарушения.

Как здесь используется, «профилактика», «предотвращение» или «предотвращать» описывает уменьшение или устранение возникновения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения и включает введение композиции апилимода для уменьшения возникновения, развития или рецидива симптомов заболевания, состояния или нарушения.

В одном варианте осуществления введение композиции апилимода приводит к устранению симптома или осложнения заболевания или нарушения, подвергаемого лечению, однако устранение не требуется. В одном варианте осуществления степень тяжести симптома уменьшается. Применительно к раку, такие симптомы могут включать клинические маркеры тяжести или прогрессирования, в том числе степень, в которой опухоль секretирует факторы роста, разрушает экстраклеточный матрикс, становится вакуляризированной, теряет адгезию к соседним тканям или метастазируют, а также количество метастазов.

Лечение рака в соответствии с описанными здесь способами может привести к уменьшению размера опухоли. Уменьшение размера опухоли также может называться «регрессией опухоли». Предпочтительно, когда после лечения размер опухоли уменьшается на 5% или более по сравнению с ее размером до лечения; более предпочтительно, когда размер опухоли уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается на более чем 75% или более. Размер опухоли может быть определен с помощью любых воспроизводимых средств измерения. Размер опухоли может быть определен как диаметр опухоли.

Лечение рака в соответствии с описанными здесь способами может привести к

уменьшению объема опухоли. Предпочтительно, когда после лечения объем опухоли уменьшается на 5% или более по сравнению с ее размером до лечения; более предпочтительно, когда объем опухоли уменьшается на 10% или более; более предпочтительно, уменьшается на 20% или более; более предпочтительно, уменьшается на 30% или более; более предпочтительно, уменьшается на 40% или более; еще более предпочтительно, уменьшается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, уменьшается на более чем 75% или более. Объем опухоли может быть определен с помощью любых воспроизведимых средств измерения.

Лечение рака в соответствии с описанными здесь способами может привести к

10 снижению числа опухолей. Предпочтительно, когда после лечения число опухолей снижается на 5% или более по сравнению с числом до лечения; более предпочтительно, когда число опухолей снижается на 10% или более; более предпочтительно, снижается на 20% или более; более предпочтительно, снижается на 30% или более; более предпочтительно, снижается на 40% или более; еще более предпочтительно, снижается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, снижается на более чем 75%. Число опухолей может быть определено с помощью любых воспроизведимых средств измерения. Число опухолей может быть определено путем подсчета опухолей, видимых невооруженным глазом, или при определенном увеличении. Предпочтительно, когда определенное увеличение составляет 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

20 Лечение рака в соответствии с описанными здесь способами может привести к снижению числа метастатических очагов в других тканях или органах, удаленных от первичного опухолевого очага. Предпочтительно, когда после лечения число метастатических очагов снижается на 5% или более по сравнению с числом до лечения; более предпочтительно, когда число метастатических очагов снижается на 10% или 25 более; более предпочтительно, снижается на 20% или более; более предпочтительно, снижается на 30% или более; более предпочтительно, снижается на 40% или более; еще более предпочтительно, снижается на 50% или более; и наиболее предпочтительно, снижается на более чем 75%. Число метастатических очагов может быть определено с помощью любых воспроизведимых средств измерения. Число метастатических очагов 30 может быть определено путем подсчета метастатических очагов, видимых невооруженным глазом, или при определенном увеличении. Предпочтительно, когда определенное увеличение составляет 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или 50x.

Используемый здесь термин «селективно (избирательно)» означает тенденцию происходить с более высокой частоте в одной популяции, чем в другой популяции.

35 Сравниваемыми популяциями могут быть клеточные популяции. Предпочтительно, когда композиция апилимода, описываемая здесь, действует селективно на гиперпролиферирующие клетки или аномально пролиферирующие клетки по сравнению с нормальными клетками. Используемый здесь термин «нормальная клетка» представляет собой клетку, которая не может быть отнесена к части «клеточного 40 пролиферативного нарушения». Нормальная клетка не характеризуется нерегулируемым или аномальным ростом или и тем, и другим, который может привести к развитию нежелательного состояния или заболевания. Предпочтительно, когда нормальная клетка обладает нормально функционирующими механизмами контроля - контрольными точками клеточного цикла. Предпочтительно, когда композиция апилимода действует 45 селективно с модулированием одной молекулярной мишени (например, являющейся мишенью киназы), но не модулирует значительно другую молекулярную мишень (например, не являющуюся мишенью киназу). Настоящим изобретением также обеспечивается способ селективного ингибирования активности фермента, такого как

киназа. Предпочтительно, событие происходит селективно в популяции А относительно популяции В, если оно происходит более чем в два раза чаще в популяции А, чем в популяции В. Событие происходит селективно, если оно происходит более чем в пять раз чаще в популяции А. Событие происходит селективно, если оно происходит более 5 чем в десять раз чаще в популяции А; более предпочтительно более чем в пятьдесят раз; еще более предпочтительно, более чем в 100 раз; и наиболее предпочтительно, более чем в 1000 раз чаще в популяции А, чем в популяции В. Например, считается, что гибель клеток происходит селективно в больных или гиперпролиферирующих клетках, если она происходила более чем в два раза чаще в больных или гиперпролиферирующих 10 клетках, чем в нормальных клетках.

**Фармацевтические композиции и препараты**

Настоящим изобретением обеспечиваются композиции апилимода, которые предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми композициями, подходящими для применения для млекопитающего, предпочтительно человека. В этом контексте 15 композиции могут, кроме того, содержать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель, причем количество является эффективным для лечения заболевания или нарушения. В одном варианте осуществления заболевание или нарушение представляет собой рак, предпочтительно лимфому и наиболее предпочтительно В-клеточную лимфому. В одном варианте осуществления заболевание или нарушение 20 представляет собой заболевание или нарушение, связанное с mTOR.

В одном варианте осуществления композиция апилимода содержит апилимод в виде свободного основания или димезилат апилимода.

В одном варианте осуществления композицию апилимода объединяют с по меньшей мере одним дополнительным активным агентом в одной лекарственной форме. В одном 25 варианте осуществления композиция, кроме того, содержит антиоксидант.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент выбирают из группы, состоящей из алкилирующего агента, интеркалирующего агента, тубулин-связывающего агента, кортикоステроида и их комбинаций. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент 30 представляет собой терапевтическое средство, выбираемое из группы, состоящей из ибрутиниба, ритуксимаба, доксорубицина, преднизолона, винкристина, велкейда и эверолимуса и их комбинаций. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент представляет собой терапевтическое средство, выбираемое из циклофосфамида, гидроксидаунорубицина (также называемого 35 доксорубицином или Adriamycin™), винкристина (также называемого Oncovin™), преднизона, преднизолона и их комбинаций. В одном варианте осуществления по меньшей мере одним дополнительным активным агентом является нетерапевтическое средство, выбираемое для уменьшения одного или более побочных эффектов композиции апилимода. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают 40 из группы, состоящей из ондансетрона, гранисетрона, доласетрона и палоносетрона. В одном варианте осуществления нетерапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из пиндолола и рисперидона.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент выбирают из ингибитора пути с участием mTOR, ингибитора PI3K, двойного 45 ингибитора PBK/mTOR, ингибитора SRC, ингибитора VEGF, ингибитора Янус-киназы (JAK), ингибитора Raf, ингибитора Erk, ингибитора фарнезилтрансфазы, ингибитора гистондеацетилазы, антимитотического агента, ингибитора оттока с множественной лекарственной устойчивостью, антибиотика и терапевтического антитела. В одном

варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный активный агент выбирают из ингибитора фарнезилтрансферазы (например, типифарниба), антимитотического агента (например, доцетаксела), ингибитора гистондеацетилазы (например, вориностата) и ингибитора оттока с множественной лекарственной 5 устойчивостью.

В одном варианте осуществления антимитотический агент выбирают из Гризофульвина, винорелбина тартрата, паклитаксела, доцетаксела, винкристина, винбластина, эпотилона А, эпотилона В, АВТ-751, СҮТ997 (Лексибулина), таблеток винфлунина, Фосбretабулина, GSK461364, ON-01910 (Ригосертиба), Ro3280, BI2536, 10 MS-P937, BI 6727 (Воласертиба), HMN-214 и MLN0905.

В одном варианте осуществления полиэфирный антибиотик выбирают из монензина натрия, нигерицина, валиномицина, салиномицина.

«Фармацевтическая композиция» представляет собой композицию, содержащую описанные здесь соединения в фармацевтически приемлемой форме, подходящей для 15 введения субъекту. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемые» относится к тем соединениям, материалам, композициям, носителям и/или лекарственным формам, которые с медицинской точки зрения подходят для применения при контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической 20 реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риска.

«Фармацевтически приемлемый наполнитель» означает наполнитель, который применим при приготовлении фармацевтической композиции, которая обычно является 25 безопасной, нетоксичной и не является ни биологически, ни в другом отношении нежелательной, и включает наполнитель, приемлемый для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения для человека. Примеры фармацевтически приемлемых наполнителей включают, без ограничения, стерильные жидкости, воду, забуференный физиологический раствор, этанол, полиол (например, глицерин, 30 пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), масла, детергенты, суспендирующие агенты, углеводы (например, глюкозу, лактозу, сахарозу или декстрон), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту или глутатион), хелатообразующие агенты, низкомолекулярные белки или их подходящие смеси.

Фармацевтическая композиция может предоставляться без расфасовки или в 35 стандартной лекарственной форме. Особенно предпочтительно приготовление фармацевтические композиции в стандартной лекарственной форме для удобства введения и единообразия дозировки. Используемый здесь термин «стандартная лекарственная форма» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению; при этом каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для вызова желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым 40 фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм настоящего изобретения обусловлена и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Стандартной лекарственной формой может быть ампула, флакон, суппозиторий, драже, таблетка, капсула, пакет для внутривенной инфузии или 45 одноцилиндровый насос в аэрозольном ингаляторе.

При терапевтических применениях дозы меняются в зависимости от агента, возраста, веса и клинического состояния пациента-реципиента, а также опыта врача или практикующего врача, назначающего терапию, и сделанной им оценки, среди других

факторов, влияющих на выбранную дозу. Как правило, доза должна быть терапевтически эффективным количеством. Дозы могут быть представлены в единицах измерения мг/кг/день (любая доза может быть приведена в соответствие с весом пациента в кг, площадью поверхности тела в  $m^2$  и возрастом в годах). Эффективным количеством фармацевтической композиции является такое количество, которое обеспечивает объективно определяемое улучшение, отмечаемое врачом или другим квалифицированным наблюдателем. Например, облегчение симптома нарушения, заболевания или состояния. Используемый здесь термин «эффективный в отношении дозы образ» относится к количеству фармацевтической композиции для вызова желаемого биологического эффекта у субъекта или в клетке.

Например, стандартная лекарственная форма может содержать от 1 нанограмма до 2 миллиграммов или от 0,1 миллиграммов до 2 граммов; или от 10 миллиграммов до 1 грамма, или от 50 миллиграммов до 500 миллиграммов или от 1 микрограмма до 20 миллиграммов; или от 1 микрограмма до 10 миллиграммов; или от 0,1 миллиграммов до 2 миллиграммов.

В одном варианте осуществления стандартная лекарственная форма содержит 25, 50, 75, 100, 200 или 300 миллиграммов активного фармацевтического ингредиента, например, апилимода в виде свободного основания или димезилата апилимода. В одном варианте осуществления стандартная лекарственная форма представляет собой форму таблетки или капсулы для пероральной доставки.

Фармацевтические композиции могут принимать любую подходящую форму (например, жидкостей, аэрозолей, растворов, летучих препаратов, аэрозолей, спреев или твердых веществ, порошков, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей и пластырей и т.п.) для введения любым желаемым путем (например, внутривенным, ингаляционным, интраназальным, пероральным, трансбукиальным, подъязычным, парентеральным, под кожным, внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривральным, интратекальным, чрескожным, чресслизистым, ректальным и т.п.). Например, фармацевтическая композиция настоящего изобретению может быть в форме водного раствора или порошка для аэрозольного введения путем ингаляции или инсуффляции (через рот или нос), в форме таблетки или капсулы для перорального введения; в форме стерильного водного раствора или дисперсии, подходящей(его) для введения или путем прямой инъекции, или путем добавления к стерильным инфузионным жидкостям для внутривенной инфузии; или в форме лосьона, крема, пены, пластиря, суспензии, раствора или суппозитория для чрескожного или чресслизистого введения.

Фармацевтическая композиция может быть в виде подходящей для перорального введения лекарственной формы, включая, но без ограничения ими, капсул, таблеток, форм для трансбукиального введения, пастилок, лепешек и жидкостей для перорального введения в виде эмульсий, водных суспензий, дисперсий или растворов. Капсулы могут содержать смеси соединения настоящего изобретения с инертными наполнителями и/или разбавителями, такими как фармацевтически приемлемые крахмалы (например, кукурузный, картофельный или маниоковый крахмал), сахара, искусственные подсластители, порошкообразные целлюлозы, такие как кристаллическая и микрокристаллическая целлюлозы, мука, желатины, камеди и т. д. В случае таблеток для перорального применения носители, которые обычно используются, включают лактозу и кукурузный крахмал. Также могут быть добавлены замасливатели, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы применимые разбавители включают лактозу и сухой кукурузный крахмал. Когда водные суспензии и/или эмульсии вводят перорально, соединение настоящего изобретения может быть

сuspended or dissolved in an oily phase, combined with emulsifiers and/or suspending agents. When desired, some may be added. plasticizers and/or correctives, and/or colorants.

Фармацевтическая композиция может быть в форме таблетки. Таблетка может

- 5 содержать стандартную дозу соединения настоящего изобретения вместе с инертным разбавителем или носителем, таким как сахар или сахарный спирт, например лактоза, сахароза, сорбит или маннит. Таблетка может, кроме того, содержать полученный из несахара разбавитель, такой как карбонат натрия, фосфат кальция, карбонат кальция или целлюлоза или ее производное, такое как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза,
- 10 гидроксипропилметилцеллюлоза, и крахмалы, такие как кукурузный крахмал. Таблетка может, кроме того, содержать связующие и гранулирующие агенты, такие как поливинилпирролидон, вызывающие дезинтеграцию агенты (например, набухаемые сшитые полимеры, такие как сшитая карбоксиметилцеллюлоза), замасливатели (например, стеараты), консерванты (например, парабены), антиоксиданты (например, 15 ВНТ), буферные агенты (например, фосфатные или цитратные буферы) и приводящие к выделению газа вещества, такие как смеси цитрата и бикарбоната.

Таблеткой может быть таблетка с покрытием. Покрытием может быть защитное пленочное покрытие (например, воск или лак) или покрытие, предназначенное для контроля высвобождения активного агента, например замедленного высвобождения 20 (высвобождения активного вещества после заданного времени выдержки после приема) или высвобождения в определенном месте в желудочно-кишечном тракте. Последнее может быть достигнуто, например, с использованием энтеросолюбильных пленочных покрытий, таких как те, которые продаются под торговым названием Eudragit®.

Препараты в виде таблеток могут быть изготовлены с помощью обычных способов

- 25 сжатия, влажного гранулирования или сухого гранулирования и использования фармацевтически приемлемых разбавителей, связывающих веществ, замасливателей, вызывающих дезинтеграцию агентов, модификаторов поверхности (в том числе поверхности-активных веществ), супернейтрализующих агентов или стабилизаторов, включающих, но без ограничения ими, стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк,
- 30 лаурилсульфат натрия, микрокристаллическую целлюлозу, кальция карбоксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, желатин, альгиновую кислоту, аравийскую камедь, ксантановую камедь, цитрат натрия, силикаты сложного состава, карбонат кальция, глицерин, декстрин, сахарозу, сорбит, дикальцийфосфат, сульфат кальция, лактозу, каолин, маннит, хлорид натрия, тальк, сухие крахмалы и сахарную 35 пудру. Предпочтительные модификаторы поверхности включают неионные и анионные модификаторы поверхности. Типичные примеры модификаторов поверхности включают, но без ограничения ими, полоксамер 188, хлорид бензалкония, стеарат кальция, цетостеариловый спирт, эмульгирующий воск из цетомакрогола, сложные эфиры сорбитана, коллоидный диоксид кремния, фосфаты, натрия додецилсульфат,
- 40 магнийалюмосиликат и триэтаноламин.

Фармацевтическая композиция может быть в форме твердой или мягкой желатиновой капсулы. В соответствии с этим препаратом соединение настоящего изобретения может находиться в твердой, полутвердой или жидкой форме.

Фармацевтическая композиция может быть в форме стерильного водного раствора

- 45 или дисперсии, подходящей для парентерального введения. Используемый здесь термин «парентеральное» включает подкожную, внутркожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, внутриартериальную, внутрисуставную, внутргрудинную, интратекальную инъекцию, инъекцию внутрь поражения и

внутричерепную инъекцию или инфузионные способы.

Фармацевтическая композиция может быть в форме стерильного водного раствора или дисперсии, подходящей для введения или путем прямой инъекции, или путем добавления к стерильным инфузионным жидкостям для внутривенной инфузии и

5 включает растворитель или дисперсионную среду, содержащую воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их подходящие смеси или одно или более растительных масел. Растворы или суспензии соединения настоящего изобретения в виде свободного основания или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной

10 с поверхностно-активным веществом. Примеры подходящих поверхностно-активных веществ приведены ниже. Дисперсии также могут быть приготовлены, например, в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах.

Фармацевтические композиции для применения в способах настоящего изобретения могут, кроме того, содержать одну или более добавок в добавление к любому носителю

15 или разбавителю (такому как лактоза или маннит), который присутствует в препарате. Одна или более добавок могут включать или состоять из одного или более поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активные вещества, как правило, имеют одну или более длинных алифатических цепей, таких как жирные кислоты, которые позволяют им встраиваться непосредственно в липидные структуры клеток

20 для усиления проникновения и поглощения лекарственного средства. Эмпирическим параметром, обычно используемым для характеристики относительной гидрофильности и гидрофобности поверхностно-активных веществ, является гидрофильно-липофильный баланс (значение «HLB»). Поверхностно-активные вещества с более низкими значениями HLB более гидрофобны и обладают большей растворимостью в маслах, тогда как

25 поверхности-активные вещества с более высокими значениями HLB более гидрофильны и обладают большей растворимостью в водных растворах. Таким образом, обычно считается, что гидрофильные поверхности-активные вещества представляют собой такие соединения, которые имеют значение HLB, превышающее приблизительно 10, а гидрофобные поверхности-активные вещества представляют собой такие соединения,

30 которые имеют значения HLB меньше приблизительно 10. Однако эти значения HLB являются просто ориентиром, поскольку для многих поверхностно-активных веществ значения HLB могут различаться на вплоть до приблизительно 8 единиц HLB, в зависимости от эмпирического способа, выбранного для определения значения HLB.

Среди поверхностно-активных веществ, используемых в композициях настоящего изобретения, находятся полиэтиленгликоль (ПЭГ)-жирные кислоты и моно- и диэфиры ПЭГ-жирных кислот, ПЭГ эфиры глицерина, продукты переэтерификации спирта и масла, полиглицерил-жирные кислоты, пропиленгликолевые эфиры жирных кислот, стерол и производные стерола, полиэтиленгликолевые эфиры сорбита и жирных кислот, алкиловые эфиры полиэтиленгликоля, сахар и его производные,

35 полиэтиленгликольалкилфенолы, блок-сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилен (POE-POP), эфиры сорбита и жирных кислот, ионные поверхностно-активные вещества, жирорастворимые витамины и их соли, водорастворимые витамины и их амфи菲尔ные производные, аминокислоты и их соли, а также органические кислоты и их сложные эфиры и ангидриды.

40 45 В настоящем изобретении также предусматривается упаковка и наборы, включающие фармацевтические композиции для применения в способах настоящего изобретения. Набор может включать один или более контейнеров, выбираемых из группы, состоящей из бутылки, флакона, ампулы, блистерной упаковки и шприца. Набор может, кроме

того, включать одну или более инструкций для применения при лечении и/или профилактики заболевания, состояния или нарушения настоящего изобретения, один или более шприцев, один или более аппликаторов или стерильный раствор, подходящий для воссоздания фармацевтической композиции настоящего изобретения.

5 Все проценты и отношения, используемые здесь, кроме особо оговоренных случаев, являются весовыми. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения очевидны из различных примеров. Приведенные примеры иллюстрируют различные компоненты и методологию, применимые для осуществления на практике настоящего изобретения. Примеры не ограничивают заявленное изобретение. Исходя из настоящего описания 10 квалифицированный специалист может идентифицировать и использовать другие компоненты и методологию, применимые для осуществления на практике настоящего изобретения.

### **ПРИМЕРЫ**

15 **Пример 1: Апилимод является в высокой степени селективным цитотоксическим агентом в раковых клетках**

Апилимод идентифицировали при скрининге с высокой пропускной способностью жизнеспособности клеток, используя TSC2-/ мышиные эмбриональные фибробласти (TSC2-/MEF), которые характеризуются конститутивно повышенной активностью передачи сигналов от mTOR. Вкратце, тестируемые соединения (5 мкл исходного 20 раствора, 6x желаемая конечная концентрация в лунках) вносили в 384-луночные аналитические планшеты, в планшеты добавляли TSC2-/MEF клетки (1000 клеток на лунку в 25 мкл среды), и планшеты инкубировали в течение 72 ч (3 дня) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> во влажной камере в течение 3 дней. Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа люминесценции CellTiter-Glo® (Promega) в соответствии 25 с инструкциями производителя. Жизнеспособность представляли в процентах от необработанных контрольных клеток. В качестве примера, для апилимода, жизнеспособность MEF-EV клеток (среднее значение±StDev (среднеквадратичное отклонение), n=3) составила 2,16±0,36% @ 0,5 мкМ и 1,94±0,07% @ 5 мкМ. На построенной по 10 точкам кривой зависимости ответа от дозы, апилимод угнетал 30 жизнеспособность клеток с IC<sub>50</sub>=19,5 нМ для тестируемых TSC2-/MEF клеток (фиг. 1). Затем апилимод тестировали на других линиях раковых клеток, включая В-клеточную лимфому (SUDHL-10), нейроглиому (H4) и колоректальный рак (HCT116), а также на 35 нераковых (нормальных) клеточных линиях, полученных из селезенки, легкого и ободочной кишки. В этих анализах жизнеспособности клеток апилимод был в высокой степени селективным ингибитором жизнеспособности раковых клетках по сравнению с нераковыми (нормальными) клетками, что демонстрируется их гораздо более высокими значениями IC<sub>50</sub>, которые были в 20-200 раз выше таковых для раковых клеток. Эти результаты представлены на фиг. 1В.

40 Цитотоксическую активность апилимода далее оценивали в 3-дневном анализе CellTiterGlo™, используя 122 линии раковых клеток человека, представляющих 24 типа опухолей. В этом 3-дневном анализе клеточную линию называли чувствительной к апилимоду, если IC<sub>50</sub> составляла менее 500 нМ. 35 линий клеток были идентифицированы как чувствительные к индуцируемой апилимодом цитотоксичности в этом анализе.

45 Апилимод-чувствительные клетки включали клетки, полученные из нескольких различных типов рака, включающих неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, колоректальный рак и рак легкого. Наиболее чувствительными из тестируемых линий были линии клеток неходжкинских лимфом (NHL). Немного больше 50%

протестированных линий клеток NHL были чувствительны к апилимоду, и некоторые подтипы NHL были чрезвычайно чувствительны к апилимоду, при этом значения  $IC_{50}$  были меньше 100 нМ (по сравнению с точкой отсечки для чувствительной/нечувствительной линии при скрининге, которая равнялась 500 нМ). Они включали 5 лимфому Беркитта человека (ST486), мантийноклеточную лимфому человека (JeKo-1) и DLBCL человека (SUDHL-4,  $IC_{50}=50$  нМ). Единственный подтип NHL, не чувствительный в этом анализе, был фолликулярным. Оба подтипа DLBCL-GCB и -ABC 10 были чувствительны к апилимоду, что указывает на то, что апилимод может быть эффективным против многих раков NHL, включая более агрессивные подтипы, которые часто не поддаются лечению с помощью стандартных методов лечения.

NHL представляет собой разнообразную группу гемопоэтических злокачественных новообразований, которые различаются по степени тяжести, при этом подтипы варьируют от медленного роста до агрессивного. Подтипы NHL включают диффузную 15 крупно-В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому Беркитта, мантийноклеточную лимфому и фолликулярную В-клеточную лимфому. DLBCL делится на два подтипа, GCB и ABC, на основе экспрессии генов и происхождения клетки. GCB представляет собой относящийся к зародышевому центру В-клеточный тип, возникающий из нормальных В-клеток зародышевого центра, а ABC представляет собой активированный 20 В-клеточный тип, возникающий из В-клеток пост-зародышевых центров в процессе дифференцировки в плазматические клетки.

Затем апилимод тестировали в более длительных анализах жизнеспособности клеток, и осуществляли сравнение чувствительности клеток, протестированных в течение 3, 5 и 7 дней. Чувствительность всех линий клеток увеличивалась с увеличением времени 25 воздействия апилимода, до  $IC_{50}$  менее 125 нМ в случае 7-дневного подвергания воздействию. Это проиллюстрировано на фиг. 2А для клеток колоректального рака HCT116. Каждый из различных подтипов NHL также продемонстрировал увеличенную 30 чувствительность к апилимоду ( $IC_{50}<125$  нМ) в 7-дневном анализе (фиг. 2В). И все подтипы NHL, в том числе мантийноклеточные, фолликулярные, Беркитта, DLBCL-ABC, DLBCL-GCB и DLBCL с двойным поражением, были чувствительны в этом анализе. Примечательно, что все линии клеток, представляющие агрессивные лимфомы, были 35 чувствительными, в том числе с двойной транслокацией (DLBCL с двойным поражением), а также мантийноклеточные лимфомы. В общем, 72% из 32 протестированных линий клеток NHL были чувствительны к апилимоду, со средними значениями  $IC_{50}=69$  нМ, по сравнению с 15,8 мкмоль (мкМ) для нераковых (нормальных) клеток.

#### **Пример 2: Апилимод действует синергетически с компонентами СНОР**

Как обсуждалось выше, клетки NHL продемонстрировали особую чувствительность к апилимоду при скрининге линий раковых клеток. DLBCL является самым 40 распространенным типом NHL, составляя 30-40% от лимфом в западных странах. DLBCL является агрессивным новообразованием из зрелых В-клеток. Приблизительно 40% всех пациентов с DLBCL переносят рецидивом после лечения первой линии. Многие рефрактерные злокачественные опухоли DLBCL-GCB демонстрируют одиночные и 45 двойные транслокации MYC и BCL2. Пациенты с этими генетическими вариантами, как правило, имеют более плохой прогноз, обусловленный, по меньшей мере, частично сверхэкспрессией MYC и BCL2. Примечательно, что апилимод был эффективен даже в линиях клеток DLBCL-GCB, демонстрирующих эти транслокации (таблица 2), поддерживая значимость в лечении даже агрессивных подтипов NHL апилимода, либо

самого по себе, в качестве монотерапии, либо в комбинации со стандартными методами лечения.

**Таблица 2.** Статус по транслокациям Bcl-2 и с-мус для линий В-клеточных лимфом и их чувствительность к апилимоду. ND=Нет данных

Номер	Модель В-клеточной лимфомы	Линия клеток	IC <sub>50</sub> (нМ)	Bcl-2	C-мус
7	DLBCL-GCB человека	SUDHL-4	25	Да	Да
8	DLBCL-GCB человека	SUDHL-6	80	Да	Нет
9	DLBCL-GCB человека	DB	150	Нет	Нет
10	DLBCL-GCB человека	Toledo	270	ND	ND
11	DLBCL-GCB человека	SUDHL-10	20	Да	Да
12	DLBCL-GCB человека	WSU-DLCL2	160	Да	Нет
13	DLBCL-GCB человека	OCI-Ly19	380	Да	Нет
20	DLBCL-GCB человека	HT	642	ND	ND
21	DLBCL-GCB человека	Pfeiffer	2620	ND	ND

При тестировании *in vitro* по отношению к другим клиническим агентам, активным против NHL, апилимод оказался одним из самых эффективных лекарственных средств, которые были протестираны (таблица 3).

**Таблица 3:** Сравнение значений IC<sub>50</sub> для апилимода и различных химиотерапевтических средств в трехдневном анализе.

Лекарственное средство	Клеточная мишень	IC <sub>50</sub> (нМ) SU-DHL-4	IC <sub>50</sub> (нМ) WSU-DLCL2
апилимод	PIKfyve	23	54
ибрутиниб	BTK	718	747
иделалисиб	PI3Kd	2034	6154
EPZ-6438	EZH2	>20000	>10000
ABT-199	BCL-2	212	3371
дувалисиб	PI3K $\gamma$ /δ	13	863
KPT-330	XPO1	93	165

С целью дальнейшей оценки эффективности апилимода против агрессивных опухолей NHL была проверена способность апилимода действовать синергетически с любым из ряда химиотерапевтических средств, которые составляют стандартное лечение первой линии для многих таких типов рака. К ним относятся, например, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизон (называемые схемой химиотерапии «CHOP»), а также химиотерапевтическое средство велкейд, который показан для рецидивирующей мантийноклеточной лимфомы.

Для исследований синергизма использовали следующие DLBCL-GCB клеточные линии: WSU-DLCL2, SUDHL-4 и SUDHL-6. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с оптимальной плотностью. Клетки обрабатывали либо каждым агентом отдельно, либо в комбинации с апилимодом. Клетки обрабатывали в течение 72 ч (3 дня) до того, как пролиферацию оценивали с использованием CellTiterGlo® (Promega). Для расчета синергизма CalcuSyn (версию 2.11, Biosoft) использовали для определения показателя объединения (CI), как определено в Chou *et al.*, *Adv. Enzyme. Regul.* (1984) 22:27-55. Таким образом, комбинаций лекарственных средств, дающая значения CI>1, были определены как антагонистические, CI=1 - как аддитивные, а CI<1 - как синергетические.

Как показано в таблице 4, апилимод продемонстрировал синергетическую активность со всеми протестированными средствами (циклофосфамидом, доксорубицином, преднизолоном, винкристином и велкейдом) в случае всех трех линий клеток. Эти результаты показывают, что комбинированная терапия с апилимодом представляет

собой многообещающий новый подход для решения неудовлетворенной медицинской потребности в лечении, которое приносит пользу пациентам, которые переносят рецидив после стандартных схем химиотерапии или которые не поддаются лечению с их помощью.

5 **Таблица 4**

Комбинированное лечение		WSU-DLCL2	SU-DHL-4	SU-DHL-6
10 Стандарт лечения	Циклофосфамид (Мафосфамид)+Апилимод	Синергетический Apili 62,5 нМ/ Maf 625 нМ Fa=0,82; CI=0,7	Синергетический Apili 125 нМ/ Maf 1250 нМ Fa=0,82; CI=0,7	Синергетический Apili 125 нМ/ Maf 1250 нМ Fa=0,77; CI=0,5
	Доксорубицин+ Апилимод	Синергетический Apili 62,5 нМ/ Dox 25 нМ Fa=0,99; CI=0,4	Синергетический Apili 500 нМ/ Dox 200 нМ Fa=0,88; CI=0,9	Синергетический Apili 250 нМ/ Dox 1100 нМ Fa=0,86; CI=0,1
	Преднизолон+Апилимод	Синергетический Apili 15,6 нМ/ Pred 156 нМ Fa=0,97; CI=0,3	Синергетический Apili 125 нМ/ Pred 625 нМ Fa=0,85; CI=0,5	Синергетический Apili 250 нМ/ Pred 556 нМ Fa=0,85; CI=0,2
	Винкристин+Апилимод	Синергетический Apili 31,3 нМ/ Vin 0,3 нМ Fa=0,97; CI=0,2	Синергетический Apili 37 нМ/ Vin 1,25 нМ Fa=0,85; CI=0,4	Синергетический Apili 37 нМ/ Vin 1,25 нМ Fa=0,85; CI=0,4
15 Другие терапии	Велкейд+Апилимод	Синергетический Apili 250 нМ/ Vel 5 нМ Fa=0,99; CI=0,3	Синергетический Apili 37 нМ/ Vel 2,5 нМ Fa=0,98; CI=0,2	Синергетический Vel 2,5 нМ Maf 625 нМ Fa=0,99; CI=0,3

Резюме эффектов от объединения лекарственных средств апилимода и отдельных компонентов СНОР, Велкейда или Эверолимуса в линиях клеток DLBCL-GCB.

- 20 25 Представлена концентрация апилимода (Apili) в комбинации или с компонентами СНОР (циклофосфамид (мафосфамид, 20)=Maf, доксорубицин=Dox, винкристин=Vin, преднизолон=Pred), или с Велкейдом (Vel) для получения относительного эффекта (Fa). Показатель объединения (CI) использовали для определения эффектов от объединения, где  $CI > 1$  является антагонистическим эффектом,  $CI = 1$  - аддитивным эффектом, а  $CI < 1$  является синергетическим эффектом, где  $Fa > 0,75$ .

**Пример 3: Синергетическая активность между апилимодом и ибрутинибом**

Ибрутиниб является разрешенным FDA лекарственным средством, мишенью которого являются В-клеточные злокачественные опухоли и который прописывают в виде монотерапии при лечении мантийноклеточной лимфомы и хронического

- 30 лимфоцитарного лейкоза. Он также известен как PCI-32765 и продается под торговым названием Imbruvica<sup>TM</sup>. Ибрутиниб является селективным и ковалентным ингибитором фермента тирозинкиназы Брутона (BTK). BTK является ключевым медиатором по меньшей мере трех важных способствующих выживанию В-клеток механизмов, возникающих параллельно: регуляции апоптоза, клеточной адгезии и миграции клеток и хоминга. Синергетическая активность апилимода с ибрутинибом также указывает на то, что апилимод является перспективным средством для применения в комбинированной терапии с другими химиотерапевтическими средствами, особенно с теми, которые направлены против В-клеточных лимфом. Ибрутиниб значительно уменьшал жизнеспособность клеток SUDHL-4 в присутствии апилимода по сравнению
- 40 с или только ибрутинибом, или только апилимодом. Смотрите фиг. 3. Этот результат был подтвержден в двух других линиях клеток, которые были протестированы: WSU-DLCL2 и SUDHL-6.

**Пример 4. Противоопухолевая активность апилимода в отношении опухолей DLBCL in vivo**

- 45 Затем была проверена способность апилимода, как в отдельности, так и в комбинации с ибрутинибом, ингибировать рост опухолей in vivo. Как описано ниже, апилимод в отдельности значительно уменьшал рост опухолей, а комбинация апилимода и ибрутиниба обеспечивала большее ингибирование роста, чем только один из двух

агентов.

Цель исследования состояла в том, чтобы оценить преклинически *in vivo* терапевтическую эффективность апилимода, в отдельности и в комбинации с ибрутинибом, при лечении модели рака DLBCL человека с использованием подкожного ксенотрансплантата клеток SUDHL-6.

В первой группе исследования апилимод был протестирован в отдельности. Линию клеток SUDHL-6 поддерживали в среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки и L-глутамином (2 мМ) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Опухолевые клетки субкультивировали дважды в неделю и собирали во время экспоненциального роста для инокуляции опухолевых клеток. Мышей NOD-SCID подвергали γ-излучению за 24 часа до инокуляции. Каждой мыши инокулировали подкожно в правый бок опухолевые клетки SU-DHL-6 ( $5 \times 10^6$ ) в 0,1 мл PBS с Матригелем (1:1). Затем опухоли выращивали до среднего размера, составляющего приблизительно 80-120 mm<sup>3</sup>, и затем мышей делили на 5 групп и лечили, как подробно описано в таблице 5.

Таблица 5: Модель опухолей DLBCL с использованием ксенотрансплантата

Группа	Лечение	Доза	Схема введения доз	Путь введения	Количество мышей
1	Носитель (солевой раствор)	-	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней	внутривенно	6
2	димезилат апилимода	67,5 мг/кг (47 мг/кг свободного основания)	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней	внутривенно	6
3	0,5% Метилцеллюлоза	-	Дважды в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Дважды в день x 5 дней	перорально	6
4	Апилимод в виде свободного основания	75 мг/кг	Дважды в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Дважды в день x 5 дней	перорально	6
5	Апилимод в виде свободного основания	150 мг/кг	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней	перорально	6

Размер опухоли определяли дважды в неделю в двух измерениях с помощью циркуля, и объем представляли в mm<sup>3</sup>, используя формулу:  $V=0,5 a \times b^2$ , где a и b - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Мышей контролировали в течение 29 дней, и наблюдалось значительное подавление роста во всех группах лечения апилимодом. Внутривенное введение уменьшало размер опухоли на 58% (47 мг/кг), а пероральное введение дозы уменьшало рост на 68% (дробная доза 150 мг/кг) или на 64% (однократная доза 150 мг/кг) с незначительным эффектом на вес тела (смотрите Фиг. 4). Таким образом, внутривенное и пероральное введение апилимода продемонстрировало схожую эффективность в уменьшении роста опухолей SU-DHL-6 *in vivo*.

Во второй группе исследования оценивали эффективность апилимода при объединении с ибрутинибом в той же модели рака DLBCL человека с использованием ксенотрансплантата клеток SUDHL-6, используя тот же протокол, что и описанный выше. Каждой мыши инокулировали подкожно в правый бок опухолевые клетки SU-DHL-6 ( $5 \times 10^6$ ) в 0,1 мл PBS с Матригелем (1:1). Затем опухоли выращивали до среднего размера, составляющего приблизительно 80-120 mm<sup>3</sup>, и затем мышей делили на 6 групп и лечили, как описано в таблице 6.

Таблица 6: Эксперимент с использованием ксенотрансплантата линии клеток

## SUDHL-6

Группа	Лечение	Доза	Схема введения доз	Путь введения	Количество мышей
5	1 Носитель	NA	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней	перорально+ внутривенно	6
	2 Апилимод в виде свободного основания	75 мг/кг	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней	перорально	6
	3 Ибрутиниб	10 мг/кг	Раз в день x 12 дней	внутривенно	6
10	4 Ибрутиниб	20 мг/кг	Раз в день x 12 дней	внутривенно	6
	5 Апилимод в виде свободного основания+ Ибрутиниб	75 мг/кг+10 мг/кг	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней+Раз в день x 12	Перорально+ внутривенно	6
	6 Апилимод в виде свободного основания+ Ибрутиниб	75 мг/кг+20 мг/кг	Раз в день x 5 дней - 2 дня без лечения - Раз в день x 5 дней+Раз в день x 12	Перорально+ внутривенно	6

Размер опухоли определяли дважды в неделю в двух измерениях с помощью циркуля,

и объем представляли в  $\text{мм}^3$ , используя формулу:  $V=0,5 a \times b^2$ , где  $a$  и  $b$  - длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Мышей контролировали в течение 31 дня, и наблюдалось значительное подавление роста в группах лечения с использованием 75 мг/кг апилимода (57%), 10 мг/кг ибрутиниба (54%) и 20 мг/кг ибрутиниба (64%).

Комбинация 75 мг/кг апилимода с ибрутинибом дополнительно уменьшала рост опухоли дозозависимым образом; 10 мг/кг ибрутиниба (65%) и 20 мг/кг ибрутиниба (70%) (смотрите фиг. 5).

**Пример 5: Апилимод является в высокой степени селективным связующим киназы PIKfyve**

С целью идентификации клеточной мишени апилимода в раковых клетках, лизат цельных клеток, полученный из клеток нейроглиомы человека, использовали для идентификации партнеров по связыванию, используя масс-спектрометрию захвата химических веществ (CCMS). Эта работа была выполнена в Caprotec Bioanalytics GmbH, Берлин, Германия. Смотрите Michaelis et al., *J. Med. Chem.*, 55 3934-44 (2012) и ссылки, приведенные в нем. Вкратце, два варианта захватывающего соединения с использованием апилимода в качестве функции селективности, присоединенного в одной ориентации, синтезировали и анализировали с помощью LC-MS (жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии) и  $^1\text{H}$ -ЯМР для обеспечения идентичности и чистоты. Условия захвата были оптимизированы в лизате цельных клеток, например, была осуществлена минимизация неспецифических взаимодействий белков с захватывающими соединениями, концентрации реагентов и белков для обеспечения максимального связывания белков и захватывающих соединений и т.д. Одно захватывающее соединение было выбрано для идентификации специфических белковых связующих в экспериментах с использованием CCMS, используя апилимод в качестве конкурентного лиганда. Белки, которые детектируются с помощью LC-MS в анализе захвата и которые значительно уменьшаются в контрольных экспериментах с использованием конкуренции, считаются специфическими связующими. Эти специфические связующие дополнительно подвергались строгим критериям анализа данных для определения специфичности после объективной оценки данных.

Специфические белковые связующие были ранжированы в соответствии с их значениями кратности изменения (FC) в экспериментах по захвату. Только два белка были идентифицированы как кандидаты с высокой вероятностью на белки-мишени апилимода: PIKfyve и Vavl4. FC и  $p$ -значения для этих белков в экспериментах с использованием четырех различных концентраций захватывающего соединения представлены в таблице

7.

Таблица 7

		Концентрации захватывающего соединения			
		0,1 мкМ	0,5 мкМ	1,0 мкМ	2,0 мкМ
PIKfyve	$\log_2$ (FC)	6,3	6,2	4,1	4,3
	$-\log_{10}$ (р-значение)	3,7	2,8	5,1	3,9
Vacl4	$\log_2$ (FC)	6,2	5,6	Inf.	3,9
	$-\log_{10}$ (р-значение)	3,9	3,8	1,9	3,6

10 В отдельном исследовании было проведен анализ протеинкиназного профиля апилимода для идентификации киназ-мишеней (DiscoveRx, Fremont, CA). Исследование константы диссоциации ( $K_d$ ) проводили с использованием апилимода при возрастающих концентрациях (0,05-3000 нМ) против PIKfyve, известной мишени апилимода. Эксперимент проводили в двух повторах, и определили, что  $K_d$  составляет 0,075 нМ (диапазон 0,069-0,081 нМ) (фиг. 6).

15 Затем апилимод был использован для скрининга обширной группы киназ (PIKfyve не включена). В общей сложности 456 киназ, в том числе свойственные заболеванию киназы, были исследованы на их способность к связыванию с апилимодом.

20 Концентрация апилимода при скрининге составляла 1 мкМ, концентрацию, которая в >10000 раз больше  $K_d$  апилимода от PIKfyve. Результаты этого скрининга показали, что апилимод не связывается ни с одной из 456 киназ.

25 Вместе эти результаты продемонстрировали, что апилимод связывается с высокой селективностью в раковых клетках с одной клеточной киназой, PIKfyve. PIKfyve является ферментом, который связывается с PI(3)P и катализирует образование липидных вторичных мессенджеров PI(3,5)P2 и PI(5)P, а другие показали, что апилимод также является сильным и специфическим ингибитором этой киназы PIKfyve в нормальных клетках. Cai X et al., *Chem Biol.* 2013 Jul 25; 20(7):912-21. Как подробнее обсуждается ниже, чтобы понять механизм селективной цитотоксичности апилимода в отношении раковых клеток, был проведен ряд экспериментов, направленных на выяснение его биологической активности в раковых клетках.

#### **Пример 6: Механизм противораковой активности апилимода**

30 Известно, что апилимод является сильным ингибитором воспалительных цитокинов IL-12 и IL-23. В том случае, когда апилимод рекомендовался для лечения заболевания или нарушения, это было основано на этой активности. Хотя клинические испытания апилимода были сосредоточены на его потенциальной эффективности при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, таких как псориаз, ревматоидный артрит и болезнь Крона, было несколько опубликованных предположений, что апилимод мог бы применяться против раков, а конкретно против раков, в которых с-  
rel или IL-12/23 действуют как пропролиферативные факторы. Смотрите, например, 40 WO 2006/128129 и Baird et al., *Frontiers in Oncology* 3: 1 (2013), соответственно.

Удивительно, и в отличие от этих ожиданий, основанных на ингибирующей IL-12/23 45 активности апилимода, авторы настоящего изобретения не обнаружили корреляции между любой из экспрессий с-Rel (с-Rel является фактором транскрипции для генов IL-12/23), IL-12 или IL-23 и чувствительностью к апилимоду в протестированных линиях клеток. Вкратце, данные об экспрессии генов из Энциклопедии линий раковых клеток (CCLE) были проанализированы для 22 линий В-клеточных лимфом, для которых авторы настоящего изобретения построили кривые зависимости ответа от дозы апилимода (смотрите таблицу 8).

**Таблица 8.** Линии В-клеточных лимфом, проанализированные на экспрессию генов и ответ на апилимод. Отмечен статус по вирусу Эпштейна-Барра и статус по ядерному cREL. ND=Нет данных.

Число	Модель В-клеточной лимфомы	Линия клеток	IC <sub>50</sub> (нМ)	EBV	Ядерный cREL
1	Лимфома Беркитта человека	ST486	25	Нет	ND
2	Лимфома Беркитта человека	Daudi	200	Да	Да
3	Лимфома Беркитта человека	EB1	174	Да	ND
4	Лимфома Беркитта человека	GA-10	382	Нет	ND
5	Мантийноклеточная лимфома человека	Rec-1	300	Нет	ND
6	Мантийноклеточная лимфома человека	JeKo-1	70	Нет	ND
7	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-4	25	Нет	Да
8	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-6	80	Нет	ND
9	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	DB	150	Нет	ND
10	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	Toledo	270	Нет	ND
11	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-10	20	Нет	ND
12	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	WSU-DLCL2	160	Нет	ND
13	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	OCI-Ly19	380	Да	ND
14	Лимфома Беркитта человека	Namalwa	600	Да	ND
15	Лимфома Беркитта человека	CA46	>10000	Нет	ND
16	Лимфома Беркитта человека	Raji	>10000	Да	Да
17	Мантийноклеточная лимфома человека	GRANTA-519	>10000	Да	ND
18	Фолликулярная В-клеточная лимфома человека	RL	>10000	ND	ND
19	Фолликулярная лимфома человека DLBCL-GCB	DOHH-2	700	Нет	ND
20	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	HT	642	Нет	ND
21	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	Pfeiffer	2620	ND	ND
22	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	KARPAS-422	>10000	Нет	ND

Экспрессию c-REL сравнивали в чувствительных (IC<sub>50</sub> менее 500 нМ) и нечувствительных (IC<sub>50</sub> более 500 нМ) линиях по непарному t-критерию. Статистически значимой связи между экспрессией c-REL и чувствительностью не обнаружено (p=0,97). Кроме того, не выявлена значимая взаимосвязь между чувствительностью к апилимоду и или наличием конститутивного ядерного c-REL, или заражением вирусом Эпштейна-Барра в линиях клеток, данные по которым были опубликованы. Протестированные линии клеток включали следующие чувствительные к апилимоду (#1-13) и нечувствительные (#14-22) линии В-клеточных лимфом: линии 1-4 лимфомы Беркитта человека (ST486, Daudi, EB1, GA-10), линии 5-6 мантийноклеточной лимфомы человека (Rec-1, JeKo-1), линии 7-13 диффузной крупно-В-клеточной лимфомы человека - GCB (SUDHL-4, SUDHL-6, DB, Toledo, SUDHL-10, WSU-DLCL2, OCI-Ly19), линии 14-16 лимфомы Беркитта человека (Namalwa, CA46, Raji), линию 17 мантийноклеточной лимфомы человека (GRANTA-519), линию 18 фолликулярной В-клеточной лимфомы человека 18 (RL), линию 19 фолликулярной лимфомы человека-DLBCL-GCB 19 (DOHH-2), диффузную крупно-В-клеточную лимфому человека - GCB (HT, Pfeiffer, KARPAS-422).

Экспрессия IL-12A, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-12B, IL-23A и IL-23R была, кроме того, проанализирована в разнообразной группе из 75 линий раковых клеток, включающей вышеупомянутые 22 линии лимфом (смотрите таблицу 9).

**Таблица 9.** Различные линии раковых клеток

Число	Модель рака	Линия клеток	IC <sub>50</sub> (нМ)
1	Лимфома Беркитта человека	ST486	25
2	Мантийноклеточная лимфома человека	JeKo-1	70

3	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-4	25
4	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-6	80
5	Лимфома Беркитта человека	Daudi	200
6	Гистиоцитарная лимфома человека	U937	106
7	Рак легкого человека	A549	110
5	Колоректальный рак человека	HCT116	125
8	В-клеточная лимфома человека	DB	150
9	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	WSU-DLCL2	160
10	Колоректальный рак человека	HCT-15	200
11	Колоректальный рак человека	SW480	90
12	Колоректальный рак человека	COLO-205	380
13	Колоректальный рак человека	SW620	90
14	Т-клеточный лейкоз человека	Jurkat	200
15	Нейроблиома человека	H4	250
16	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB		270
17	Неходжкинская В-клеточная лимфома человека	Rec-1	300
18	Лимфома Ходжкина человека	KMH-2	181
19	Лимфома Беркитта человека	EB1	174
20	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	SUDHL-10	20
21	Лимфома Беркитта человека	GA-10	382
22	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	OCI-Ly19	380
23	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	HT	642
24	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	Pfeiffer	2620
25	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	Namalwa	600
26	Лимфома Беркитта человека	DOHH-2	700
27	Фолликулярная В-клеточная лимфома человека-GCB	SW780	1000
28	Рак мочевого пузыря человека (GATOR-/-)	MDST8	1000
29	Колоректальный рак человека	Raji	10000
30	Лимфома Беркитта человека	HD-MyZ	>1000
25	Лимфома Ходжкина человека	L540	>1000
32	Лимфома Ходжкина человека	HDLM-2	>1000
33	Лимфома Ходжкина человека	CA46	>10000
34	Лимфома Беркитта человека	SUDHL-1	590
35	Анапластическая крупноклеточная лимфома человека	H1734	1500
36	Рак легкого человека	SW1116	1500
30	Колоректальный рак человека	COLO-320DM	2060
38	Колоректальный рак человека	A172	2000
39	Нейробластома человека	H1693	2000
40	Рак легкого человека	H460	>2000
41	Рак легкого человека	H358	>2000
35	Рак поджелудочной железы человека	CAPAN2	>2000
43	Рак поджелудочной железы человека	PANC1	>2000
44	Рак поджелудочной железы человека	MiaPaCa-2	>2000
45	Рак поджелудочной железы человека	AsPC1	>2000
46	Рак поджелудочной железы человека	DU145	>2000
47	Рак предстательной железы человека	KG-1	>2500
48	Острая миелогенная лейкемия человека	LnCap	3000
40	Рак предстательной железы человека	HH	3300
49	Т-клеточная лимфома человека	MOLT-4	3300
50	Т-клеточный лейкоз человека	22RV1	>5000
51	Рак предстательной железы человека	DLD-1	>5000
52	Колоректальный рак человека	K562	>5000
45	Миелогенная лейкемия человека	RKO	>5000
53	Колоректальный рак человека	TOV-21G	7000
54	Рак яичника человека	PC-3	10000
55	Рак предстательной железы человека	L428	10000
56	Лимфома Ходжкина человека	RPMI-8226	>10000
57	Плазмацитома человека		

60	Рак легкого человека	NCI-1975	>10000
61	Рак молочной железы человека	CAMA1	>10000
62	Нейробластома человека	SW1088	>10000
63	Нейробластома человека	M0591K	>10000
643	Нейробластома человека	U-118 MG	>10000
65	Нейробластома человека	U-87 MG	>10000
66	Острый моноцитарный лейкоз человека	THP1	>10000
67	Диффузная крупно-В-клеточная лимфома человека - GCB	KARPAS-422	>10000
68	Фолликулярная В-клеточная лимфома человека	RL	>10000
69	Мантийноклеточная лимфома человека	GRANTA-519	>10000
70	Бронхоальвеолярный рак человека	NCI-H1650	>20000
71	Бронхоальвеолярный рак человека	SW1573	>20000
72	Бронхоальвеолярный рак человека	NCI-H1781	>20000
73	Бронхоальвеолярный рак человека	NCI-H1666	20000
74	Колоректальный рак человека	LOVO	>10000
75	Колоректальный рак человека	HT-29	>10000

15 Вкратце, данные экспрессии генов из CCLE были проанализированы для 75 линий раковых клеток, для которых были построены кривые зависимости ответа от дозы апилимода. Экспрессию каждого гена интерлейкина сравнивали в чувствительных ( $IC_{50}$  менее 500 нМ) и нечувствительных ( $IC_{50}$  более 500 нМ) линиях по непарному t-критерию. 20 Никакой статистически значимой связи не было найдено, за единственным исключением IL-23A ( $p=0,022$ ). Ранее было отмечено, что IL-23A повышен в чувствительных к алиномоду линиях немелкоклеточного рака легкого, и было отмечено, что рекомбинантный IL-23A увеличивает пролиферацию линий немелкоклеточного рака легкого (смотрите Baird et al. 2013, смотрите выше). Важно отметить, что статистическая 25 значимость экспрессии IL-23A в чувствительных линиях рака, по-видимому, полностью диктуется как раз двумя линиями рака ободочной кишки. Кроме того, экспрессия IL-23A не является статистически значимым прогностическим фактором чувствительности в неходжкинской В-клеточной лимфоме (фиг. 7).

30 PIKfyve образует липидные продукты PI(3,5)P<sub>2</sub> и PI5P, которые, в свою очередь, служат для установления мембранный идентичности и контроля эндолизосомальной динамики. Исследования показали, что истощение PI(3,5)P<sub>2</sub>, возникающее вследствие ингибирования PIKfyve, порождает фенотип раздутой эндолизосомы. Исходя из этих 35 исследований авторы настоящего изобретения проверили взаимосвязь между апилимодом, ингибированием PIKfyve и эндолизосомальной дисфункцией. Как показано на фиг. 8, эксперименты авторов настоящего изобретения показали, что апилимод вызывает уменьшение на приблизительно 70% PI(3,5)P<sub>2</sub> в клетках нейроглиомы H4 через 24 ч (фиг. 8A), и эти клетки демонстрируют поразительный фенотип раздутой эндолизосомы (вакуоли) (Фиг. 8B). Этот фенотип был обратимым, и линии раковых 40 клеток возвращались к нормальному виду в течение 3-4 дней после удаления лекарственного средства.

Затем авторы настоящего изобретения проверили, может ли репрессия продукта гена PIKfyve повторить цитотоксический эффект, наблюдаемый с апилимодом, в одной из тестируемых линий клеток, клетках нейроглиомы H4. Как показано на фиг. 9, индукция индуцируемой доксициклином шпильки, мишенью которой является 45 транскрипт PIKFYVE, порождала фенотип раздутой эндолизосомы и резкое уменьшение жизнеспособности клеток H4.

Вместе представленные здесь данные подтверждают вывод о том, что противораковые свойства апилимода возникают благодаря ингибированию им PIKfyve.

**Пример 7: Фармакокинетика апилимода у людей**

Преклинические данные авторов настоящего изобретения наводят на мысль, что апилимод может быть активен у пациентов с NHL, если в клинических испытаниях могут быть достигнуты соответствующие концентрации в плазме. Фармакокинетика (PK) апилимода была установлена в испытаниях фазы 1, хотя ранее об этом не сообщалось. Вкратце, параметры PK для апилимода у здоровых добровольцев определяли после однократного перорального приема в виде либо 1 дозы, либо разделенной на 2 приема через 10 часов дозы в соответствии со следующей схемой введения доз (таблица 10).

Таблица 10: Фаза 1, исследование увеличения дозы (раз в день/два раза в день) на здоровых добровольцах. Субъекты были рандомизированы для получения либо активного агента, либо плацебо. Введение дозы проводилось в один день, при этом введение дозы раз в день - только утром, а введение доз дважды в день - утром и вечером.

Группа	Доза на каждое введение	Частота	Суммарная доза
A	7 мг	Один раз	7 мг
B	7 мг	x2	14 мг
C	14 мг	x2	28 мг
D	35 мг	x2	70 мг
E	70 мг	x2	140 мг
F	105	x2	210 мг

PK кривые концентраций апилимода во времени показаны на фиг. 5. При приеме два раза в день 105 мг (общая суточная доза 210 мг) апилимод имел средние концентрации в плазме 192 и 149 нг/мл в утренние и вечерние часы, соответственно (таблица 11).

Таблица 11: Резюме объединенных мужских и женских PK параметров для апилимода

в виде свободного основания в плазме человека. <sup>A</sup>Доза вводимая два раза в день с 10-ч интервалом между утренней и вечерней дозой, за исключением группы А, которая получила одну дозу. Число субъектов составляло n=9 для всех групп, кроме Е, в которой один субъект не был включен в анализ из-за аномальных концентраций. Представленные значения C<sub>max</sub> представляют собой средние значения для 8 или 9 субъектов.

Лечение	Доза (мг) <sup>a</sup>	C <sub>max</sub> (нг/мл) утром	C <sub>max</sub> (нг/мл) вечером
A	7	10,8 ± 2,7	NA
B	14	12,7 ± 5,9	8,18 ± 2,73
C	28	18,2 ± 5,8	10,7 ± 5,0
D	70	71,8 ± 17,1	63,0 ± 22,6
E	140	145 ± 30	110 ± 43
F	210	192 ± 51	149 ± 38

Кроме того, на протяжении ~50% 24-часового периода концентрации апилимода в плазме оставались выше 50 нг/мл (=125 нМ); точки отсечки IC<sub>50</sub> для чувствительности на фиг. 3В. Также предполагается, что эти концентрации в плазме будут иметь фармакодинамический (PD) эффект, поскольку апилимод вызывает образование вакуолей в мононуклеарных клетках периферической крови после лечения в течение 24 ч.

Апилимод имел удовлетворительный профиль безопасности при приеме 105 мг два раза в день, хотя большинство исследований эффективности фазы 2 предыдущего спонсора в условиях хронического воспалительного заболевания проводили в общих суточных дозах 100 мг (или ниже). Эти данные показывают, что концентрации апилимода, способные эффективно подавлять рост NHL in vitro и, вероятно, иметь PD-

эффект, достижимы у людей, тем самым поддерживая запланированное авторами настоящего изобретения исследование увеличения дозы апилимода фазы 1 на NHL.

(57) Формула изобретения

5 1. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту композиции, содержащей апилимод или его фармацевтически приемлемую соль, в количестве, эффективном для ингибирования клеточной РКfуve активности в раковых клетках субъекта, где способ также включает введение по меньшей мере одного дополнительного агента, выбранного из ингибиторов контрольной точки 10 10 пути передачи сигналов, включающей рецептор запрограммированной смерти 1 (PD-1) и/или его лиганды (PD-L1/2).

15 2. Способ по п. 1, в котором рак представляет собой рак головного мозга, глиому, саркому, рак молочной железы, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мезотелиому, аппендикулярный рак, рак мочеполовой системы, почечноклеточный рак, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак полового члена, рак шейки матки, рак яичников, болезнь фон Хиппеля-Линдау, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, гепатоцеллюлярный рак, рак желчного пузыря, рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, 20 нейроэндокринную опухоль, опухоль щитовидной железы, опухоль гипофиза, опухоль надпочечников, гематологическую злокачественную опухоль, лимфому или лейкоз.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором рак представляет собой В-клеточную лимфому.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором рак представляет собой неходжкинскую В-клеточную лимфому.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором субъектом является человек.

25 6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором стадию введения выполняют в течение по меньшей мере одного цикла, состоящего из по меньшей мере одного дня введения композиции, содержащей апилимод, с последующим по меньшей мере одним следующим днем без введения композиции, содержащей апилимод.

7. Способ по п. 6, в котором стадию введения выполняют в течение 2-10 циклов.

30 8. Способ по п. 7, в котором стадию введения выполняют в течение 2-5 циклов.

9. Способ по любому из пп. 6-8, в котором цикл состоит из 1-10 непрерывных дней введения композиции с последующими 1-5 непрерывными днями без введения композиции.

35 10. Способ по любому из пп. 6-8, в котором цикл состоит из 2-5 непрерывных дней введения композиции с последующими 1-2 непрерывными днями без введения композиции.

11. Способ по любому из пп. 6-8, в котором цикл состоит из 5 непрерывных дней введения композиции с последующими 2 непрерывными днями без введения композиции.

40 12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором композиция апилимода содержит апилимод в виде свободного основания или димезилат апилимода.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором композиция апилимода представляет собой лекарственную форму для перорального введения или лекарственную форму, подходящую для внутривенного введения.

45 14. Способ по любому из пп. 4-13, в котором неходжкинскую В-клеточную лимфому выбирают из диффузной крупно-В-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта, медиастинальной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и мантийноклеточной лимфомы.

15. Способ по п. 14, в котором неходжкинской В-клеточной лимфомой является

фолликулярная лимфома.

16. Способ по п. 14 или 15, в котором неходжкинская В-клеточная лимфома является не поддающейся лечению или рецидивирующей.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором по меньшей мере один дополнительный активный агент вводят в той же композиции, что и содержащая апилимод композиция, или в композиции, отдельной от содержащей апилимод композиции.

10

15

20

25

30

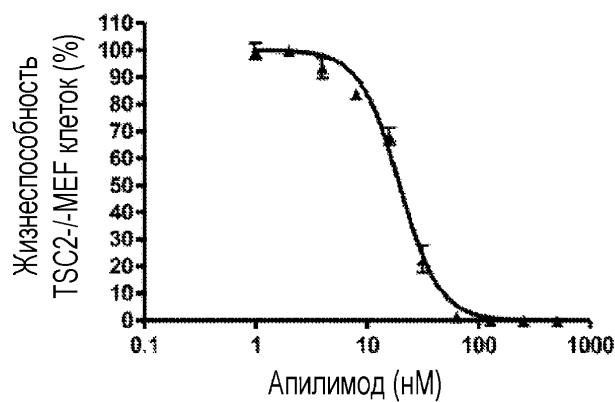
35

40

45

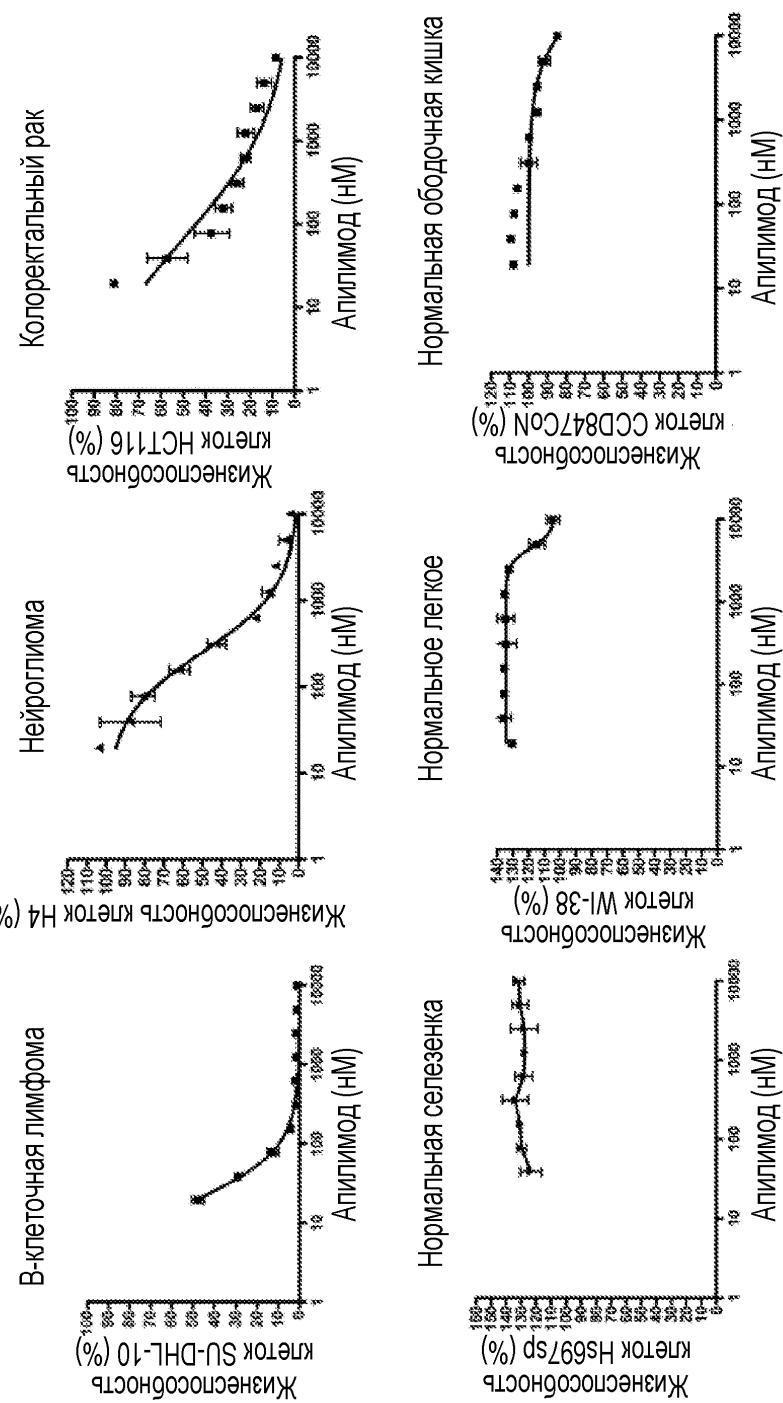
1/13

ФИГ. 1А



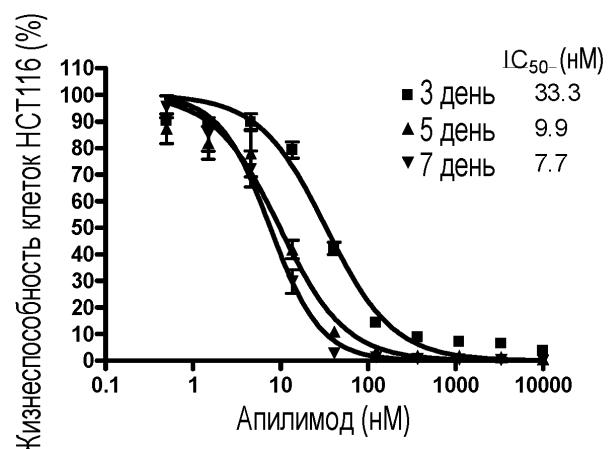
2/13

ФИГ. 1В



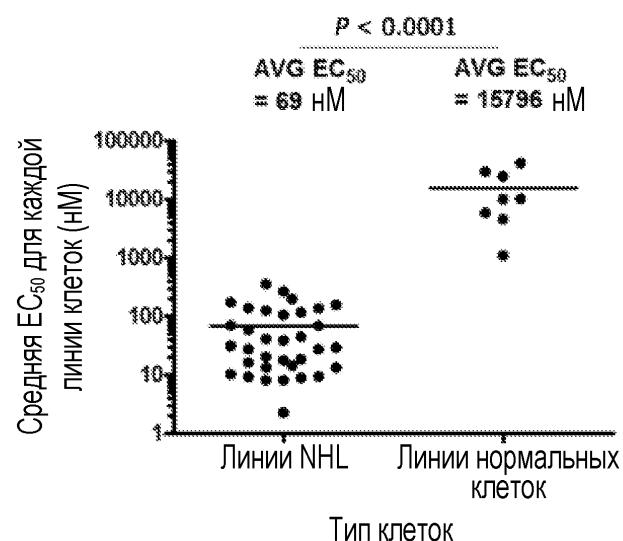
3/13

ФИГ. 2А



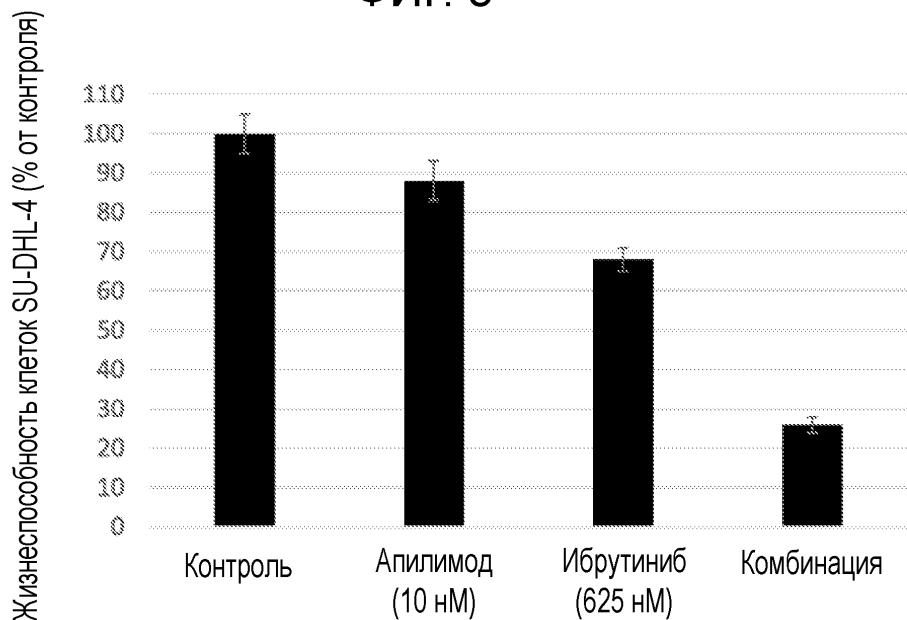
4/13

## ФИГ. 2В



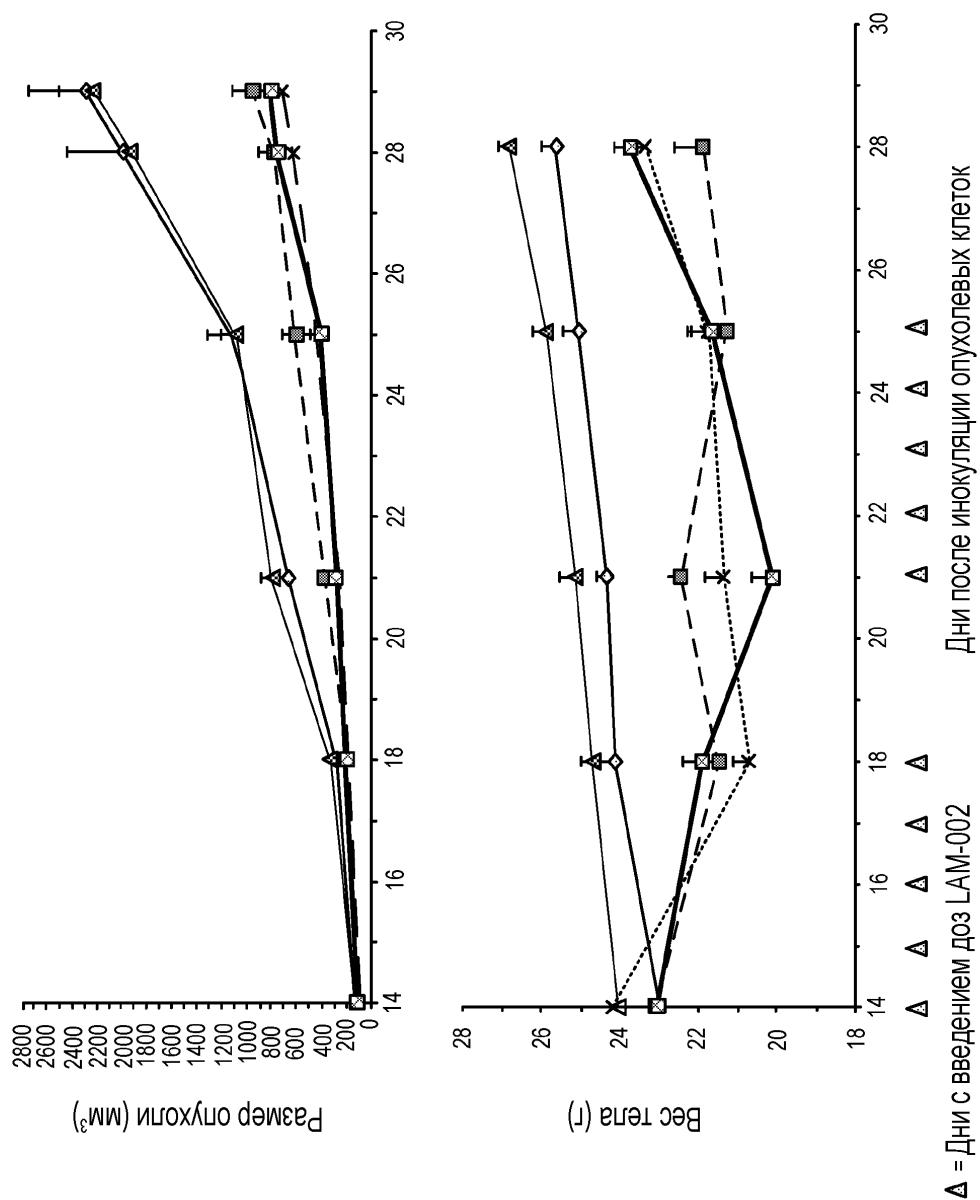
5/13

ФИГ. 3

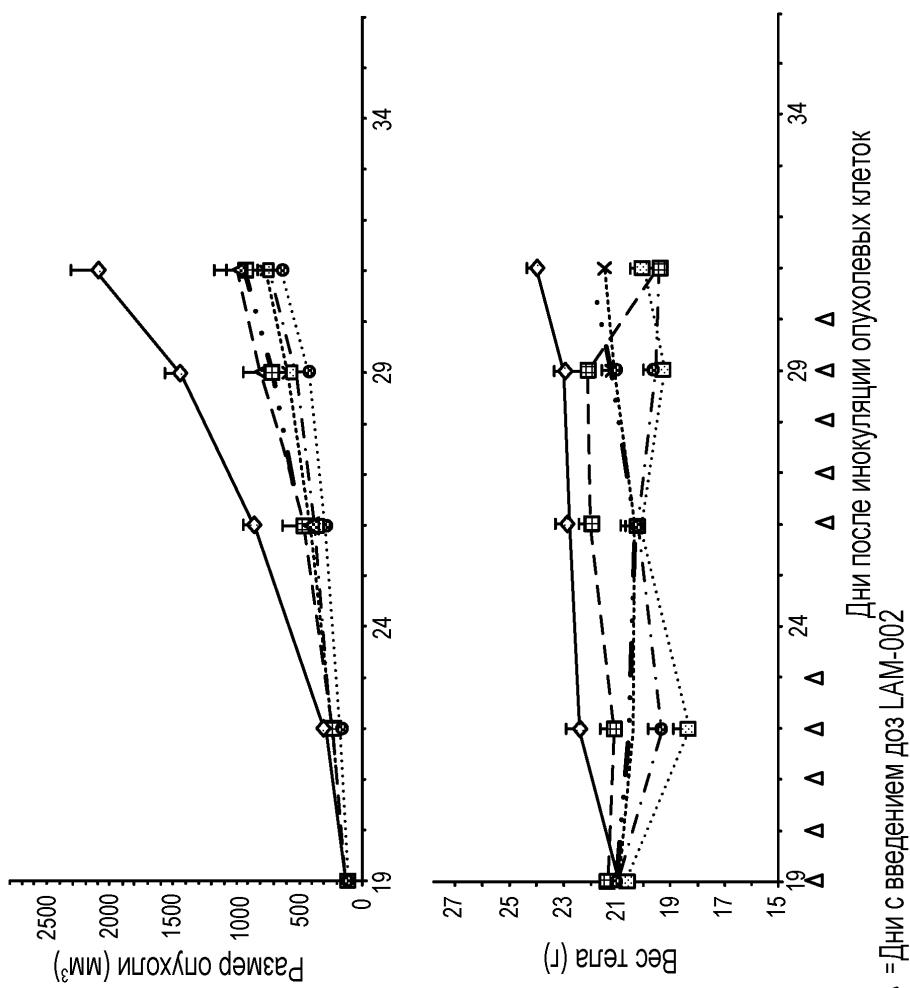


6/13

ФИГ. 4



7/13

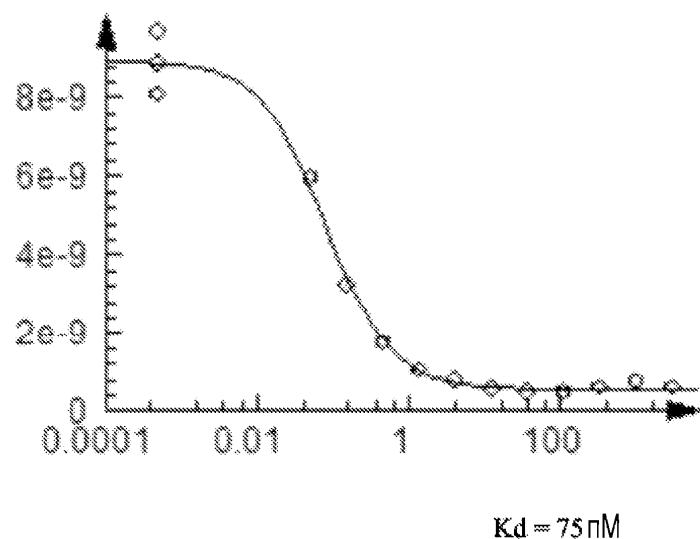


ФИГ. 5

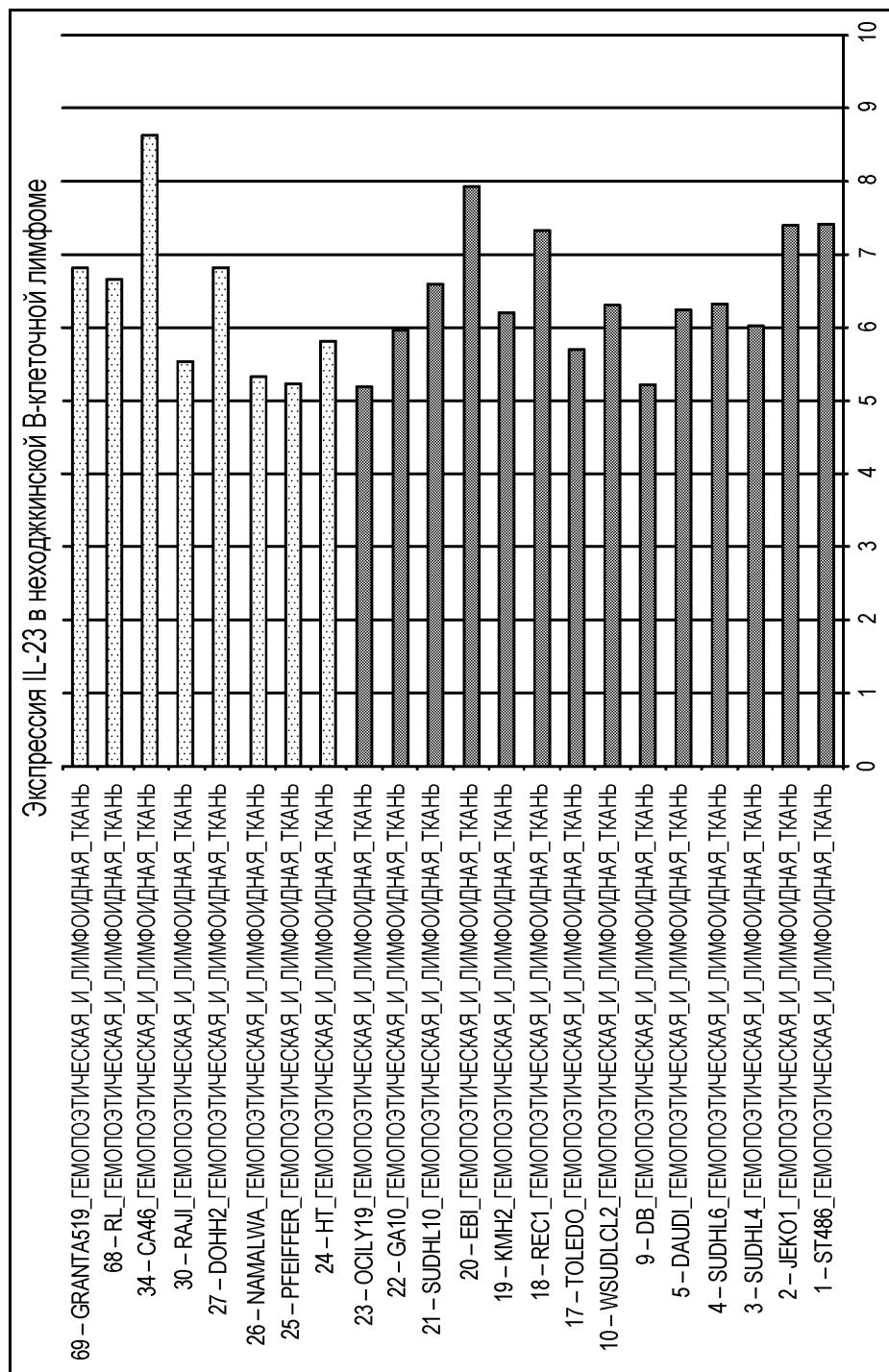
Δ = Дни с введением доз LAM-002  
Дни после инокуляции отуховых клеток

8/13

ФИГ. 6



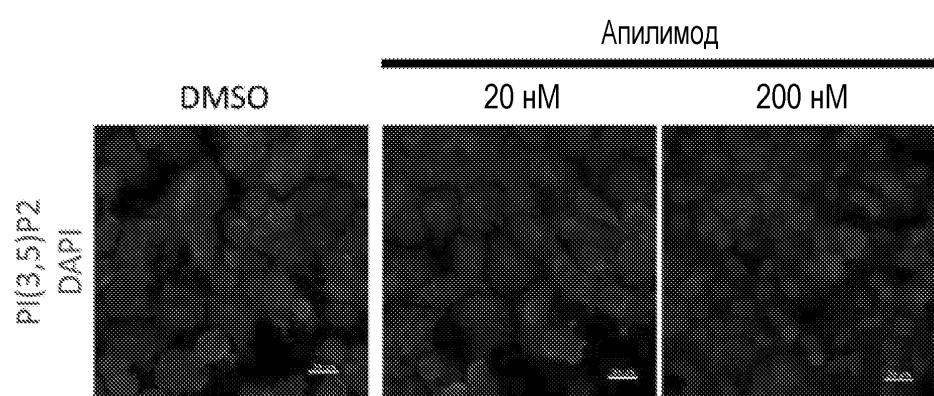
9/13



ФИГ. 7

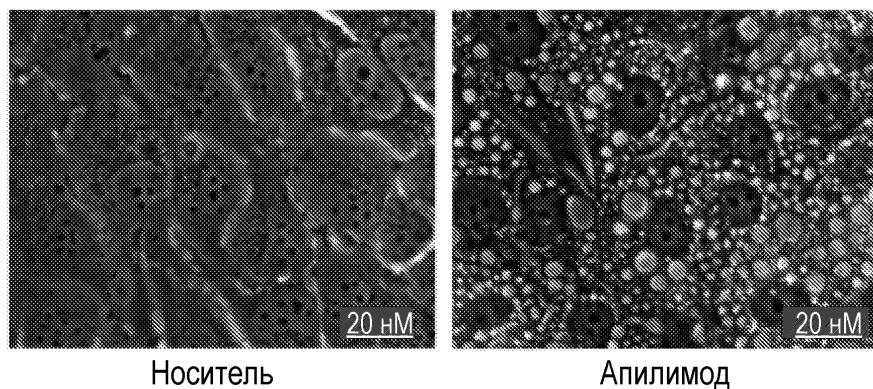
10/13

ФИГ. 8А

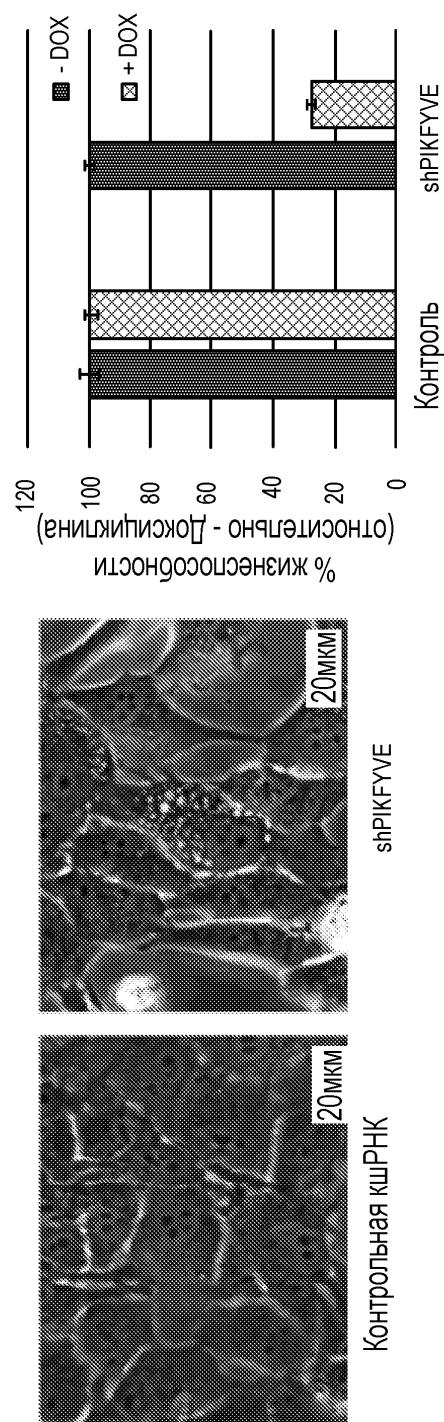


11/13

ФИГ. 8В



12/13



ФИГ. 9А

13/13

ФИГ. 9В

