

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2



(19)

RU

(11)

2 745 678

⁽¹³⁾ **C2**

(51) МПК

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/685 (2021.01); *A61P 35/00* (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2017140676, 29.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.04.2016

Дата регистрации:
30.03.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.04.2015 US 62/154,699;
30.04.2015 US 62/155,451;
07.05.2015 US 62/158,469;
15.07.2015 US 62/192,940;
15.07.2015 US 62/192,944;
06.11.2015 US 62/252,085;
09.11.2015 US 62/252,916;
10.12.2015 US 62/265,663;
10.12.2015 US 62/265,696;
10.12.2015 US 62/265,658;

(см. прод.)

(43) Дата публикации заявки: 29.05.2019 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 30.03.2021 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 29.11.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2016/030316 (29.04.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/176664 (03.11.2016)

Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко
Оксана Юрьевна

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к онкологии, и может быть использовано для

(72) Автор(ы):

ХЭТТЕРСЛИ Гэри (US)

(73) Патентообладатель(и):

РАДИУС ФАРМАСЫЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014203129, 24.12.2014. US
20110124617, 25.05.2011. ALLURI P.G. et al.
Estrogen receptor mutations and their role in
breast cancer progression//Breast Cancer Res.
2014 Dec 12;16(6):494. doi: 10.1186/s13058-014-
0494-7, реферат.

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2

лечения рака молочной железы (РМЖ). Способ
по изобретению включает введение субъекту,

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2

страдающему от РМЖ, положительного по рецептору эстрогенов альфа, который устойчив к лекарственным препаратам и/или содержит мутантный рецептор эстрогенов альфа, терапевтически эффективного количества

комбинации эверолимуса и RAD1901. Использование изобретения позволяет ингибировать рост и достичь регрессии опухоли за счет синергетического действия комбинации. 17 з.п. ф-лы, 36 ил., 14 табл., 5 пр.

(30) (продолжение):

10.12.2015 US 62/265,774;
15.04.2016 US 62/323,572;
15.04.2016 US 62/323,576

R U 2 7 2 7 4 5 6 7 8 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11) 2 745 678⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 31/685 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 31/685 (2021.01); A61P 35/00 (2021.01)

(21)(22) Application: 2017140676, 29.04.2016

(24) Effective date for property rights:
29.04.2016

Registration date:
30.03.2021

Priority:

(30) Convention priority:
29.04.2015 US 62/154,699;
30.04.2015 US 62/155,451;
07.05.2015 US 62/158,469;
15.07.2015 US 62/192,940;
15.07.2015 US 62/192,944;
06.11.2015 US 62/252,085;
09.11.2015 US 62/252,916;
10.12.2015 US 62/265,663;
10.12.2015 US 62/265,696;
10.12.2015 US 62/265,658;

(to be continued)

(43) Application published: 29.05.2019 Bull. № 16

(45) Date of publication: 30.03.2021 Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: 29.11.2017

(86) PCT application:
US 2016/030316 (29.04.2016)

(87) PCT publication:
WO 2016/176664 (03.11.2016)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Karpenko
Oksana Yurevna

(72) Inventor(s):
HATTERSLEY, Gary (US)

(73) Proprietor(s):
RADIUS PHARMACEUTICALS, INC. (US)

R U

2 7 4 5 6 7 8

C 2

(54) METHODS FOR TREATING CANCER

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular to oncology, and can be used for treating

breast cancer (BC). According to the invention, the inventive method consists in introducing an estrogen-positive alpha to a subject suffering from BC, which is

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2

drug-resistant and/or contains a mutant alpha estrogen receptor, a therapeutically effective quantity of a combination of everolimus and RAD1901.

EFFECT: use of the invention enables inhibiting

the growth and achieving regression of the tumor by the synergistic action of the combination.

18 cl, 36 dwg, 14 tbl, 5 ex

(30) Convention priority:
10.12.2015 US 62/265,774;
15.04.2016 US 62/323,572;
15.04.2016 US 62/323,576

R U 2 7 4 5 6 7 8 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/154,699, поданной 29 апреля 2015 года, предварительной заявки США №62/155,451, поданной 30 апреля 2015 года, предварительной заявки США №62/252,085, поданной 6 ноября 2015, предварительной заявки США №62/265,696, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/158,469, поданной 7 мая 2015, предварительной заявки США №62/252,916, поданной 9 ноября 2015 года, предварительной заявки США №62/265,774, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/192,940, поданной 15 июля 2015 года, предварительной заявки США №62/265,658, поданной 10 декабря 2015 года, предварительной заявки США №62/323,572, поданной 15 апреля 2016 года, предварительной заявки США №62/192,944, поданной 15 июля 2015 года, предварительной заявки США №62/265,663, поданной 10 декабря 2015 года, и предварительной заявки США №62/323,576, поданной 15 апреля 2016 года, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Рак молочной железы подразделяют на три подтипа на основании экспрессии трех рецепторов: рецептора эстрогенов (estrogen receptor, ER), рецептора прогестеронов (progesterone receptor, PR) и рецептора эпидермального фактора роста-2 человека (human epidermal growth factor receptor-2, Her2). Сверхэкспрессия ER обнаружена у многих пациентов, страдающих от рака молочной железы. На ER-положительные (ER+) варианты рака молочной железы приходится две трети всех вариантов рака молочной железы. Помимо рака молочной железы эстроген и ER связаны, например, с раком яичников, раком толстой кишки, раком предстательной железы и раком эндометрия.

[0003] ER могут активироваться эстрогеном и транслоцироваться в ядро для связывания с ДНК, посредством чего регулируется активность различных генов. См., например, публикации Marino et al., "Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription," Curr. Genomics 7(8): 497-508 (2006), и Heldring et al., "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets," Physiol. Rev. 87(3): 905-931 (2007).

[0004] Средства, которые ингибируют выработку эстрогена, такие как ингибиторы ароматазы (ИА, например, летрозол, анастrozол и аромазин), или которые блокируют непосредственно активность ER, такие как селективные модуляторы рецептора эстрогенов (СМРЭ, например, тамокси芬, торемифен, дролокси芬, идокси芬, ралокси芬, лазофокси芬, арзокси芬, мипрокси芬, левормелокси芬 и EM-652 (SCH 57068)) и селективные супрессоры рецептора эстрогенов (ССРЭ, например, фулвестрант, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ранее применялись для лечения ER-положительных вариантов рака молочной железы либо разрабатываются для данных целей.

[0005] СМРЭ (например, тамокси芬) и ИА часто применяют в качестве системной адъювантной терапии первой линии для ER-положительного рака молочной железы. Тамокси芬 широко применяется для лечения ER-положительного рака молочной железы. ИА подавляют наработку эстрогена в периферических тканях посредством блокирования активности ароматазы, которая в организме превращает андроген в эстроген. Однако ИА не могут остановить выработку эстрогена яичниками. Таким образом, ИА применяют, главным образом, для лечения женщин в постменопаузальном периоде. Более того, поскольку ИА являются гораздо более эффективными, чем тамокси芬, и характеризуются меньшим количеством серьезных побочных эффектов,

ИА можно также применять для лечения женщин в пременопаузальном периоде с подавленной функцией яичников. См., например, публикацию Francis et al., "Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer," N. Engl. J. Med., 372:436-446(2015).

[0006] В то время как начальное лечение данными средствами может быть успешным,

- 5 у многих пациентов в конечном итоге случается рецидив устойчивых к лекарственным препаратам вариантов рака молочной железы. Мутации, поражающие ER, были признаны одним из потенциальных механизмов развития такой устойчивости. См., например, публикацию Robinson et al., "Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer," Nat Genet. 45:1446-51 (2013). Мутации в лиганд-связывающем
- 10 домене (ЛСД) ER обнаружены в 21% образцов метастазирующей ER-положительной опухоли молочной железы от пациентов, проходивших по меньшей мере один курс эндокринного лечения. Jeselsohn, et al., "ESR1 mutations - a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer," Nat. Rev. Clin. Oncol, 12:573-83 (2015).

[0007] На сегодняшний день фулвестрант является единственным ССРЭ, одобренным

- 15 для лечения ER-положительных метастазирующих вариантов рака молочной железы с прогрессированием заболевания после антиэстрогеновой терапии. Несмотря на клиническую эффективность данного средства, практическая ценность фулвестранта ограничена количеством лекарственного препарата, которое можно ввести за одну инъекцию, а также сниженной биодоступностью. Визуализирующие методы исследования
- 20 с применением позитронно-эмиссионной томографии на основе 18F-фторэстрадиола (ФЭС-ПЭТ) свидетельствуют о том, что даже при дозировке 500 мг у некоторых пациентов не достигается полное ингибирование ER, и недостаточное введение доз может стать причиной неудачной терапии.

[0008] Другой проблемой, связанной с направленными на эстроген видами терапии,

- 25 является то, что такие виды терапии могут оказывать нежелательное воздействие на матку, кости и другие ткани. ER направляет транскрипцию эстроген-чувствительных генов в широком спектре типов тканей и клеток. Данные эффекты могут быть в особенности выраженным в виде эндогенных уровней эстрогена и других гормонов яичников, которые снижаются в течение менопаузы. Например, тамоксифен может
- 30 вызывать истончение костей у женщин в пременопаузальном периоде и увеличивать риск рака эндометрия, поскольку данное средство выступает в качестве частичного агониста в отношении эндометрия. У женщин в постменопаузальном периоде лечение с помощью ИА может вызывать более серьезную атрофию костной ткани и большее количество переломов костей, чем в случае применения тамоксифена. Пациенты,
- 35 которые получали лечение фулвестрантом, также подвержены риску развития остеопороза в связи с механизмом действия данного средства.

[0009] Путь фосфоинозитид 3-киназы (PI3K)/протеинкиназы В (AKT)/мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) представляет собой внутриклеточный путь передачи сигналов, важный для регуляции клеточного цикла. Частая активация пути

- 40 PI3K/AKT/mTOR при раке и его ключевая роль в росте и выживаемости клеток обуславливают проблему обнаружения соответствующего уровня пролиферации по сравнению с дифференциацией для применения данного равновесия при разработке различных вариантов терапии. См., например, публикацию Gitto et al., "Recent insights into the pathophysiology of mTOR pathway dysregulation," Res. Rep. Bio., 2:1-16 (2015).

- 45 [0010] Ингибиторы пути PI3K оказались наиболее многообещающими при введении в комбинации с другими вариантами терапии. Например, эверолимус, аллостерический ингибитор mTOR, был одобрен в 2012 году для применения в комбинации с ИА эксеместаном для лечения женщин в постменопаузальном периоде, страдающих от

запущенного рецептор гормона - положительного (HR+), HER2- рака молочной железы (исследование BOLERO-2). Средства, нацеленные на другие компоненты пути PI3K, разрабатываются для лечения HR+рака, например, АТФ-конкурентные двойные ингибиторы PI3K и mTOR (например, BEZ235, GDC-0980), пан-PI3K ингибиторы,

- 5 которые ингибируют все четыре изоформы PI3K класса I (например, BKM120, GDC-0941), специфичные к изоформам ингибиторы различных изоформ PI3K (например, BYL719, GDC-0032), аллостерические и каталитические ингибиторы AKT (MK2206, GDC-0068, GSK2110183, GSK2141795, AZD5363) и АТФ-конкурентные ингибиторы исключительно mTOR (AZD2014, MLN0128 и CC-223). Dienstmann et al., "Picking the point
10 of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors," Mol. Cancer Ther., 13(5):1021-31 (2014).

[0011] Несмотря на огромный потенциал ингибиторов mTOR, нежелательные побочные эффекты, связанные с данными средствами, препятствовали разработке данных соединений в качестве эффективных вариантов противораковой терапии. Kaplan
15 et al., "Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors," Transplant Rev (Orlando), 28(3):126-133 (2014); и Pallet et al., "Adverse events associated with mTOR inhibitors," Expert Opin. Drug Saf. 12(2):177-186 (2013).

- [0012] Сохраняется потребность в более долговременных и эффективных вариантах терапии, нацеленных на ER, которые могут преодолеть проблемы, связанные с
20 применяемыми на сегодняшний день вариантами эндокринной терапии, одновременно обеспечивая дополнительную пользу посредством сочетания со вторыми терапевтическими средствами (например, эверолимусом и другими средствами, нацеленными на путь передачи сигналов PI3K/AKT/mTOR) для борьбы с раком на запущенной стадии и/или с устойчивостью к предшествующим вариантам лечения.

25 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [0013] Один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения одного или нескольких вариантов рака и/или опухолей у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества комбинации RAD1901 или сольватов (например, гидрата) или солей указанного соединения и одного
30 или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса), описанных в настоящей заявке.

[0014] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой эстроген-зависимый рак, такой как рак молочной железы, рак яичников, рак прямой кишки, рак эндометрия или рак предстательной железы. Согласно
35 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой ER-положительный рак молочной железы.

- [0015] RAD 1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе
40 терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) вводят в комбинации субъекту, который нуждается в таком введении. Фраза «в комбинации» означает, что RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли можно вводить до, в течение или после введения второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса). Например, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства можно вводить с интервалом
45 приблизительно одну неделю, с интервалом приблизительно 6 дней, с интервалом приблизительно 5 дней, с интервалом приблизительно 4 дня, с интервалом приблизительно 3 дня, с интервалом приблизительно 2 дня, с интервалом приблизительно 24 часа, с интервалом приблизительно 23 часа, с интервалом приблизительно 22 часа, с интервалом приблизительно 21 час, с интервалом приблизительно 20 часов, с

интервалом приблизительно 19 часов, с интервалом приблизительно 18 часов, с интервалом приблизительно 17 часов, с интервалом приблизительно 16 часов, с интервалом приблизительно 15 часов, с интервалом приблизительно 14 часов, с интервалом приблизительно 13 часов, с интервалом приблизительно 12 часов, с интервалом приблизительно 11 часов, с интервалом приблизительно 10 часов, с интервалом приблизительно 9 часов, с интервалом приблизительно 8 часов, с интервалом приблизительно 7 часов, с интервалом приблизительно 6 часов, с интервалом приблизительно 5 часов, с интервалом приблизительно 4 часа, с интервалом приблизительно 3 часа, с интервалом приблизительно 2 часа, с интервалом приблизительно 1 час, с интервалом приблизительно 55 минут, с интервалом приблизительно 50 минут, с интервалом приблизительно 45 минут, с интервалом приблизительно 40 минут, с интервалом приблизительно 35 минут, с интервалом приблизительно 30 минут, с интервалом приблизительно 25 минут, с интервалом приблизительно 20 минут, с интервалом приблизительно 15 минут, с интервалом приблизительно 10 минут или с интервалом приблизительно 5 минут. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства вводят одновременно или по существу одновременно. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения соединения можно вводить в качестве части одного состава.

[0016] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства вводят в отдельных составах. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения составы могут относиться к одному типу. Например, оба состава могут быть разработаны для перорального введения (например, посредством двух отдельных драже) или для инъекции (например, посредством двух отдельных инъекционных составов). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства могут быть приготовлены в состав в различных типах составов. Например, одно соединение может находиться в составе, разработанном для перорального введения, в то время как другое находится в составе, разработанном для инъекции.

[0017] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства вводят в качестве части единого состава. Например, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства приготовлены в состав в одном драже для перорального введения или в разовой дозе для инъекции. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящей заявке предложены составы, содержащие RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и одно или несколько вторых терапевтических средств.

[0018] Пути введения RAD1901 или сольватов (например, гидрата) или солей указанного соединения и/или второго терапевтического средства или средств включают, но не ограничиваются ими, местное введение, пероральное введение, внутрикожное введение, внутримышечное введение, интраперитонеальное введение, внутривенное введение, внутрипузырную инфузию, подкожное введение, трансдермальное введение и чресслизистое введение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ И ТАБЛИЦ

[0019] Фиг. 1. RAD1901 ингибирал рост опухоли на различных полученных от пациента ксенотрансплантатных (patient-derived xenograft, PDx) моделях вне зависимости от статуса ESR1 и предшествующей эндокринной терапии. Показан процент ингибирования роста опухоли (ИРО) на PDx моделях, получавших лечение RAD1901.

[0020] Фиг. 2: Комбинация RAD1901 и эверолимуса продемонстрировала ингибирование роста и регрессию опухоли на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 с ER α дикого типа (ДТ) (PR+, HER2-). (А): Рост опухоли ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о. (перорально), о.р.д. (один раз в день)), фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к. (подкожно), о.р.н. (один раз в неделю)), комбинацией фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, «НЗ» означает «не значимо», *р-значение<0,05, и ***р-значение<0,001; (В): Изменение объема индивидуальной опухоли по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), комбинацией фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинациями RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.) (С): Рост опухоли ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), комбинацией фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), RAD1901 (30 или 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (30 или 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.).

[0021] Фиг. 3: Комбинация RAD1901 и эверолимуса продемонстрировала ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на PDx-11 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2+, ранее получавшие лечение ингибитором ароматазы, фулвестрантом и химиотерапией). (А): Рост опухоли PDx-11 моделей, получавших лечение контролем - наполнителем, фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.); (В): Изменение объема индивидуальной опухоли по сравнению с исходным уровнем до окончания исследования на моделях PDx-11, получавших лечение контролем - наполнителем, фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.). n=8-10/группу.

[0022] Фиг. 4: Комбинация RAD1901 и эверолимуса продемонстрировала ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на PDx-2 моделях с ER+ДТ (PR+, Her2+, не получавшие лечения). (А) Рост опухоли PDx-2 моделей, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.), фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и фулвестранта (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.). (В): Рост опухоли PDx-2 моделей, получавших лечение контролем - наполнителем, эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.). n=8-10/группу.

[0023] Фиг. 5: Эффективность RAD 1901 сохранялась в течение по меньшей мере двух месяцев после окончания лечения RAD1901, в то время как лечение эстрadiолом продолжали, на PDx-4 моделях с ER α ДТ (PR+, Her2+, не получавшие лечения).

[0024] Фиг. 6: Комбинация RAD1901 и эверолимуса продемонстрировала

ингибиование роста опухоли на PDx-5 моделях с мутантным (Y537S) ER α (PR+, Her2+, ранее получавшие лечение ингибиторами ароматазы). (A): Рост опухоли PDx-5 моделей, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг п.о., о.р.д.) и фулвестрантом (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.); (B): Рост опухоли PDx-5 моделей, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901 (60 мг/кг п.о., о.р.д.), эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.) и комбинацией RAD1901 (60 мг/кг п.о., о.р.д.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о., о.р.д.). n=8-10/группу.

[0025] Фиг. 7: Фармакокинетический анализ фулвестранта на бестимусных мышах. Показана концентрация в плазме фулвестранта в концентрации 1 мг/дозу (закрашенный ромб), 3 мг/дозу (закрашенный круг) и 5 мг/дозу (закрашенный треугольник). Бестимусным мышам вводили подкожно фулвестрант в день 1 и вторую дозу в день 8. Концентрацию фулвестранта в плазме контролировали в указанные временные точки в течение до 168 часов после введения второй дозы.

[0026] Фиг. 8: Эффект RAD1901 и фулвестранта (Фаслодекса) в отношении

выживаемости мыши на внутричерепной модели MCF-7 на мышах.

[0027] Фиг. 9: Иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки субъекта, получавшего лечение 200 и 500 мг RAD1901 п.о., о.р.д., и изменение занятости ER после вариантов лечения RAD1901. (A): Поперечный вид скана КТ матки до (a) и после (c) лечения 200 мг RAD1901, и поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (b) и после (d) лечения RAD 1901; (B): Сагиттальный вид скана КТ матки до (верхний чертеж (a)) и после (нижний чертеж (a)) лечения 500 мг RAD1901, сагиттальный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (верхний чертеж (b)) и после (нижний чертеж (b)) лечения RAD1901, поперечный вид скана КТ матки до (верхний чертеж (c)) и после (нижний чертеж (c)) лечения RAD1901, поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки до (верхний чертеж (d)) и после (нижний чертеж (d)) лечения RAD1901; (C): % изменения занятости ER после вариантов лечения RAD1901 субъектов 1-3 (200 мг) и субъектов 4-7 (500 мг) по сравнению с исходным уровнем (перед лечением RAD1901).

[0028] Фиг. 10: Иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки (A) и гипофиза (B) перед (На исходном уровне) и после (После лечения) лечения RAD1901 (500 мг). (a) Боковое поперечное сечение; (b) продольное поперечное сечение; и (c) продольное поперечное сечение.

[0029] Фиг. 11: Экспрессия PR и ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901, эверолимусом, комбинацией RAD1901 и эверолимуса, фулвестрантом и комбинацией фулвестранта и эверолимуса.

[0030] Фиг. 12: Лечение RAD1901 привело к полной деградации ER и ингибирировало передачу сигналов посредством ER на линиях клеток MCF-7 (A) и линиях клеток T47D (B) *in vitro*. Экспрессия ER была показана на обеих линиях клеток, получавших лечение RAD1901 и фулвестрантом, при различных концентрациях 0,001 мкМ, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ, соответственно. Передача сигналов посредством ER была показана

трремя генами-мишениями ER, исследование которых проводили: PGR, GREB1 и TFF1.

[0031] Фиг. 13: Лечение RAD1901 привело к деградации ER и отмене передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (A): Вестернблоттинг, демонстрирующий экспрессию PR и ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и

фулвестрантом 3 мг/дозу, через 2 часа или через 8 часов после введения последней дозы; (B): экспрессия белка ER на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и фулвестрантом 3 мг/дозу, через 2 часа после введения последней дозы; (C): экспрессия белка PR на

ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем, RAD 1901 в дозе 30 и 60 мг/кг и фулвестрантом 3 мг/дозу, через 8 часов после введения последней дозы.

[0032] Фиг. 14: Лечение RAD1901 привело к быстрому снижению уровня PR на

- 5 ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (A): Вестернблоттинг, демонстрирующий экспрессию PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем и RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг, через 8 часов или через 12 часов после введения однократной дозы; (B): Вестернблоттинг, демонстрирующий экспрессию PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение
- 10 контролем - наполнителем и RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг, через 4 часа или через 24 часа после введения 7-ой дозы; (C): Дозозависимое уменьшение экспрессии PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение RAD1901 в дозе 30, 60 и 90 мг/кг.

[0033] Фиг. 15: Лечение RAD1901 привело к быстрому уменьшению пролиферации

- 15 на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. (A): Иллюстративная фотография рассеченной опухоли, взятой у ксенотрансплантатных моделей MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем и RAD1901 в дозе 90 мг/кг, через 8 часов после введения однократной дозы и через 24 часа после введения 4-ой дозы, и окрашенной в отношении маркера пролиферации Ki-67; (B): Гистограмма, демонстрирующая снижение
- 20 уровня маркера пролиферации Ki-67 на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, получавших лечение контролем - наполнителем и RAD1901 в дозе 90 мг/кг, через 8 часов после введения однократной дозы и через 24 часа после введения 4-ой дозы.

[0034] Фиг. 16: Лечение RAD1901 в дозе 30, 60 и 120 мг/кг уменьшало уровень Ki67

- 25 более значительно, чем фулвестрант (1 мг/животное), в конце исследования опухолей PDx-4 моделей через четыре часа в последний день исследования эффективности длительностью 56 дней.

[0035] Фиг. 17: Лечение RAD1901 в дозе 60 и 120 мг/кг привело к уменьшению

передачи сигналов посредством ER *in vivo* на PDx-5 моделях с уменьшенной экспрессией PR.

- 30 [0036] Фиг. 18: Эффект RAD1901 в отношении ткани матки на недавно отученных от матери самках крыс Спрег-Доули. (A): Чистая масса матки крыс, которым проводили эвтаназию через 24 часа после введения последней дозы; (B): высота эпителия на срезах тканей матки; (C): Иллюстративные срезы ткани матки, окрашенные толуидиновым синим O, при 400x увеличении, стрелками показан эпителий матки; (D): Суммарная
- 35 РНК, выделенная из ткани матки и проанализированная методом количественной ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) для определения уровня экспрессии комплемента C3 относительно гена домашнего хозяйства 18S рибосомальной РНК.

[0037] Фиг. 19: Результаты определения фармакокинетики RAD1901 в плазме в дозе

- 40 200, 500, 750 и 1000 мг/кг после введения в день 7.

[0038] Фиг. 20: 3ERT (I).

[0039] Фиг. 21: 3ERT (II).

[0040] Фиг. 22: Наложения комплексов ЛСД ER α - антагонист, обобщенных в таблице 11.

- 45 [0041] Фиг. 23: Моделирование (A) RAD1901-1R5K; и (B) GW5-1R5K.

[0042] Фиг. 24: Моделирование (A) RAD1901-1SJ0; и (B) E4D-1SJ0.

[0043] Фиг. 25: Моделирование (A) RAD1901-2JFA; и (B) RAL-2JFA.

[0044] Фиг. 26: Моделирование (A) RAD1901-2BJ4; и (B) OHT-2BJ4.

[0045] Фиг. 27: Моделирование (A) RAD1901-2IOK; и (B) IOK-2IOK.

[0046] Фиг. 28: Наложения конформаций RAD1901, полученных в результате анализа ДИС (докинг индуцированного соответствия) 1R5K и 2OUZ.

5 [0047] Фиг. 29: Наложения конформаций RAD1901, полученных в результате анализа ДИС 2BJ4 и 2JFA.

[0048] Фиг. 30: Наложения конформаций RAD1901, полученных в результате анализа ДИС 2BJ4, 2JFA и 1SJ0.

[0049] Фиг. 31: ДИС RAD1901 с 2BJ4.

10 [0050] Фиг. 32: Взаимодействия поверхности белка RAD1901, состыкованного в 2BJ4 посредством ДИС.

[0051] Фиг. 33: ДИС фулвестранта с 2BJ4.

[0052] Фиг. 34: ДИС фулвестранта и RAD1901 с 2BJ4.

[0053] Фиг. 35: Наложения ДИС фулвестранта и RAD1901 с 2BJ4.

15 [0054] Фиг. 36: Анализ связывания RAD1901 с конструкциями ERα ДТ и мутантным ЛСД *in vitro*.

[0055] Таблица 1. Уровни RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге мышей, которым имплантировали клетки MCF7, после лечения в течение 40 дней. НПКО: ниже предела количественного определения.

20 [0056] Таблица 2. СУН (стандартизированные уровни накопления) для матки, мышц и костей для субъекта-человека, получавшего лечение дозой 200 мг п.о., один раз/день в течение шести дней.

[0057] Таблица 3. СУН для матки, мышц и костей для субъектов-людей (n=4), получавших лечение дозой 500 мг п.о., один раз/день в течение шести дней.

25 [0058] Таблица 4. Эффект RAD1901 в отношении МПК (минеральной плотности костей) на крысах после овариоэктомии. Взрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство - овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу лечения). МПК измеряли посредством двухэмиссионной рентгеновской абсорбциометрии на исходном уровне и после 4 недель лечения. Данные выражены в виде среднего значения ±СО (стандартное отклонение). *P<0,05 по сравнению с соответствующим случаем OVX (овариоэктомия) + Контроль наполн. МПК, минеральная плотность костей; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; Наполн, наполнитель.

30 [0059] Таблица 5. Эффект RAD1901 в отношении микроархитектуры бедренной кости на крысах после овариоэктомии. Взрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство - овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) один раз в день (n=20 на группу лечения). Через 4 недели микроархитектуру кости оценивали с применением компьютерной микротомографии. Данные выражены в виде среднего значения ±СО. *P<0,05 по сравнению с соответствующим случаем OVX + Контроль наполн. КПК, кажущаяся плотность костей; ОК/ОО, плотность объема костей; ПлотнСоед, плотность соединительной ткани; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; ЧТ, число трабекул; ТТ, толщина трабекул; РМТ, расстояние между трабекулами; Наполн, наполнитель.

40 [0060] Таблица 6. Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования 1 фазы с увеличением дозы RAD1901.

[0061] Таблица 7. Наиболее частые (>10%) связанные с лечением НЯ (нежелательные явления) в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901. НЯ классифицировали согласно CTCAE v4.0 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, общей

терминологии критериев нежелательных явлений). Любой пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. * $>10\%$ пациентов в суммарной активной группе, у которых наблюдалась любые связанные с лечением НЯПНЛ (нежелательные явления, возникшие после начала лечения). N = количество субъектов с по меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории.

5 [0062] Таблица 8. Фармакокинетические параметры в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901 (день 7).

[0063] Таблица 9. Частота мутаций ЛСД.

10 [0064] Таблица 10. Различия комплексов ЛСД ER- α - антагонист в положениях остатков по сравнению с ZERT.

[0065] Таблица 11. Оценка наложения структур комплексов ЛСД ER- α - антагонист посредством расчетов СКО (среднего квадратичного отклонения). [0066] Таблица 12. Анализ связывания лиганда в комплексах ЛСД ER- α - антагонист.

15 [0067] Таблица 13. Оценка модели для докинга RAD1901.

[0068] Таблица 14. Показатель докинга индуцированного соответствия RAD1901 с 1R5K, 1SJ0, 2I7A, 2BJ4 и 2OUZ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 [0069] Как изложено в разделе примеров ниже, комбинация RAD1901 и эверолимуса (комбинация PAO1901-эверолимус) (структуры ниже) продемонстрировала большее ингибирование роста опухоли, чем RAD1901 в монотерапии, на нескольких ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы, включая ксенотрансплантатную модель MCF-7 с ER α дикого типа (ДТ) (фиг. 2A-C), PDx-2 (фиг. 4A-B) и PDx-11 модели (фиг. 3A-B) с ER α ДТ и PDx-5 модель с мутантным ER α (например, Y537S) (фиг. 6A-B), вне зависимости от ESR1 статуса и предшествующей эндокринной терапии, как описано в примере I(A)). PDx-2, PDx-5 и PDx-11 модели содержали опухоль, экспрессирующую ДТ или мутантный (например, Y537S) ER α , с экспрессией PR, с высоким или низким уровнем экспрессии Her2, и с предшествующей эндокринной терапией (например, ИА, фулвестрантом) и/или химиотерапией (химио) или без таковой (фиг. 1). RAD1901 в монотерапии также ингибировал рост опухоли на всех других PDx моделях, перечисленных на фиг. 1, которые содержали опухоль, экспрессирующую ДТ или мутантный (например, Y537S) ER α , с экспрессией PR, с высоким или низким уровнем экспрессии Her2, и с предшествующей эндокринной терапией или без таковой (например, тамоксифеном (там), ИА, фулвестрантом), химиотерапией (химио), ингибиторами Her2 (Her2 и, например, трастузумабом, лапатинибом), бевацизумабом и/или ритуксимабом.

35 [0070] PDx модели с ER ДТ и PDx модели с мутантным ER могут характеризоваться различным уровнем восприимчивости к лечению фулвестрантом в монотерапии, эверолимусом в монотерапии и/или комбинацией фулвестранта и эверолимуса (комбинация фул-эверолимус). Однако комбинации PAO1901-эверолимус продемонстрировали улучшенное ингибирование роста опухоли и/или регрессию опухоли по сравнению с лечением RAD1901 в монотерапии или эверолимусом в монотерапии вне зависимости от того, отвечали ли PDx модели на лечение фулвестрантом и/или лечение комбинацией фул-эверолимус. Другими словами, комбинация RAD1901-эверолимус может ингибировать рост опухоли и/или обеспечивать регрессию опухоли на вариантах рака, устойчивых к фулвестранту.

40 [0071] Лечение комбинацией RAD1901-эверолимус продемонстрировало улучшенное ингибирование роста опухоли и/или регрессию опухоли по сравнению с лечением фулвестрантом в монотерапии или комбинацией фул-эверолимус. Например, комбинация

RAD1901-эверолимус вызвала более значительную регрессию опухоли на большинстве ER + ДТ ксенотрансплантатных моделях, чем лечение фулвестрантом в монотерапии, RAD1901 в монотерапии или эверолимусом в монотерапии, несмотря на то, что данные ксенотрансплантатные модели демонстрировали различную восприимчивость к лечению

5 фулвестрантом (например, ксенотрансплантатная модель на основе линии клеток MCF-7, восприимчивая к лечению фулвестрантом (фиг. 2); PDx-11 модель, восприимчивая к лечению фулвестрантом (фиг. 3); и PDx-2 модель, в меньшей степени восприимчивая к лечению фулвестрантом (фиг. 4)). Комбинация RAD1901-эверолимус также вызвала более значительную регрессию опухоли на большинстве ER + ДТ ксенотрансплантатных

10 моделях на основе линии клеток MCF-7 и PDx-11 моделях, чем лечение комбинацией фул-эверолимус (фиг. 2 и 3). Комбинация RAD1901-эверолимус обеспечивала аналогичные эффекты, как и RAD1901 в дозе 30 мг/кг или 60 мг/кг, несмотря на то, что RAD1901 в монотерапии в дозе 30 мг/кг являлся не настолько эффективным, как RAD1901 в монотерапии в дозе 60 мг/кг при ингибировании роста опухоли (фиг. 2C).

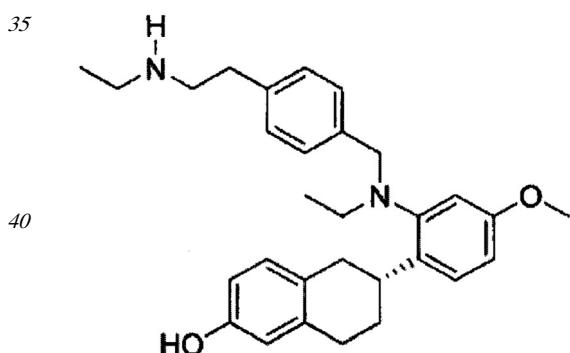
15 Данные результаты свидетельствуют, что комбинации RAD1901-эверолимус с меньшей дозой RAD1901 (например, 30 мг/кг) было достаточно, чтобы увеличить до максимума эффекты ингибирования роста опухоли/регрессии опухоли на указанных ксенотрансплантатных моделях.

[0072] Комбинация RAD1901-эверолимус продемонстрировала регрессию опухоли

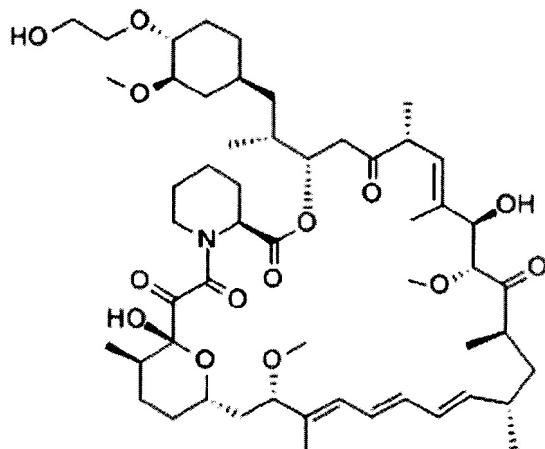
20 или улучшенное ингибирование роста опухоли на PDx моделях с мутантным ER+ (например, Y537S), слабо восприимчивых к лечению фулвестрантом (фиг. 6A). Например, PDx-5 представляет собой PDx модель с мутантным ER Y537S (PR+, Her2-, предшествующее лечение ИА), слабо восприимчивую к лечению фулвестрантом. Комбинация RAD1901-эверолимус продемонстрировала регрессию опухоли на PDx-5

25 модели, в то время как эверолимус в монотерапии или RAD1901 в монотерапии исключительно ингибировали рост опухоли, не вызывая регрессии опухоли (фиг. 6B). Комбинация RAD1901-эверолимус вызвала более значительное ингибирование роста опухоли, чем RAD1901 в монотерапии, эверолимус в монотерапии, фулвестрант в монотерапии на мутантных PDx-5 моделях (фиг. 6B). Таким образом, добавление

30 эверолимуса обеспечило пользу в отношении PDx-5 моделей при применении в комбинации с RAD1901. Таким образом, комбинации RAD1901-эверолимус обеспечивали мощную противоопухолевую терапию ER+ рака молочной железы, экспрессирующего ER ДТ или мутантный ER, с экспрессией PR, с высоким или низким уровнем экспрессии Her2 и с устойчивостью к фулвестранту или без таковой.



RAD1901



Эверолимус

[0073] Результаты, представленные в настоящей заявке, также продемонстрировали, что RAD1901 может быть доставлен в головной мозг (пример II), и что указанная доставка улучшала выживаемость мыши на внутричерепной модели на мышах, экспрессирующих ER_α дикого типа (ксенотрансплантатная модель MCF-7, пример I (B)). Эверолимус был одобрен для лечения субэпендимальной гигантоклеточной астроцитомы (СГКА), опухоли головного мозга, наблюдаемой с туберозным склерозом (ТС). Таким образом, оба компонента комбинации RAD1901-эверолимус, вероятно, способны пересекать гематоэнцефалический барьер и лечить ER+ опухоли в головном мозге. Данное свойство представляет собой дополнительное преимущество по сравнению с комбинацией фул-эверолимус для лечения ER+ опухолей в головном мозге, поскольку фулвестрант не может пересекать гематоэнцефалический барьер (Vergotet et al., "Fulvestrant, a new treatment option for advanced breast cancer: tolerability versus existing agents," Ann. Oncol., 17(2):200-204 (2006)). Комбинация RAD1901 с другим вторым терапевтическим средством или средствами, которые способны пересекать гематоэнцефалический барьер (например, ингибиторами mTOR, такими как аналоги рапамицина (Geoerger et al., "Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy," Cancer Res. 61:1527-1532 (2001))), может также оказывать аналогичные терапевтическое воздействие на ER+ опухоли в головном мозге.

[0074] RAD1901 продемонстрировал устойчивую эффективность при ингибировании роста опухоли после окончания лечения RAD1901, в то время как лечение эстрadiолом продолжали (например, PDx-4 модель). Таким образом, комбинация RAD1901-эверолимус, вероятно, обеспечивает пользу пациентам посредством ингибирования роста опухоли после окончания лечения, в особенности, когда лечение вторым терапевтическим средством или средствами могут прекращать (например, 29% в случае эверолимуса) или снижать или отсрочивать (70% в случае пациентов, получавших лечение эверолимусом) в связи с нежелательными реакциями. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm488028.htm>.

[0075] Комбинация RAD1901-эверолимус, вероятно, характеризуется более редкими и/или менее тяжелыми побочными эффектами, чем лечение эверолимусом в монотерапии или комбинацией эверолимуса с другими вариантами гормональной терапии (например, ИА, такими как летрозол, и ССРЭ, такими как фулвестрант). Например, как ИА, так и фулвестрант могут вызывать атрофию костной ткани у пациентов, получавших лечение. Маловероятно, что RAD1901 будет оказывать аналогичные побочные эффекты.

Было обнаружено, что RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухоли, причем уровень RAD1901 в опухоли по сравнению с уровнем RAD1901 в плазме (соотношение О/П) составляет до приблизительно 35 (пример II). Стандартизированные уровни накопления (СУН) для матки, мышц и костей рассчитывали для субъектов-людей,

- 5 получавших лечение RAD1901 в ежедневной дозе от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг (пример III(A)). После введения доз сигналы для матки были близки к уровням из «тканей, отличных от тканей-мишеней» (тканей, которые не экспрессируют рецептор эстрогенов), что свидетельствует о полном затухании накопления ФЭС-ПЭТ после лечения RAD1901. Практически не наблюдалось изменений
- 10 на сканах ПЭТ перед лечением по сравнению со сканами после лечения в тканях, которые по существу не экспрессировали рецептор эстрогенов (например, мышцы, кости) (пример III(A)). Наконец, варианты лечения RAD1901 выступали в качестве антагонистов стимуляции эстрadiолом тканей матки у крыс после овариоэктомии (OVX) (пример IV(A)), и в значительной степени сохраняли качество костей субъектов,
- 15 получавших лечение. Например, у крыс OVX, получавших лечение RAD1901, наблюдалось сохранение МПК и микроархитектуры бедренной кости (пример IV(A)). Таким образом, комбинация RAD1901-эверолимус может быть в особенности пригодной для пациентов, страдающих от остеопороза, или подверженных более высокому риску остеопороза.

- 20 [0076] Более того, сообщалось, что профилирование экспрессии генов является эффективным для обнаружения пациентов, восприимчивых к лечению эверолимусом. Yoon et al., "Gene expression profiling identifies responsive patients with cancer of unknown primary treated with carboplatin, paclitaxel, and everolimus: NCCTG N0871 (alliance)," Ann. Oncol, 27(2):339-44 (2016). В исследовании NCT00805129 было установлено, что
- 25 эверолимус является более эффективным у пациентов, у которых присутствуют соматические мутации в TSC1, поскольку указанные мутации приводят к увеличению времени возникновения рецидива и к увеличению времени ответа на эверолимус. Таким образом, способы, раскрытие в настоящей заявке, могут также включать профилирование генов субъектов, лечение которых проводят, с целью обнаружения
- 30 субъектов с большим ответом и/или более длительным временем ответа.

- [0077] Более того, было обнаружено, что RAD1901 вызывает деградацию ER α дикого типа и отменяет передачу сигналов посредством ER *in vivo* на ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7, и вызывает дозозависимое уменьшение уровня PR на данных ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7 (пример III(B)). RAD1901 уменьшает пролиферацию на ксенотрансплантатных моделях на основе линии клеток MCF-7 и на PDx-4 моделях, что подтверждается снижением уровня маркера пролиферации Ki67 в опухолях, взятых у субъектов, получавших лечение. RAD1901 также уменьшает передачу сигналов посредством ER *in vivo* на PDx модели с мутантным ER, которая была слабо восприимчива к лечению фулвестрантом (пример III(B)).

- 40 [0078] Неожиданная эффективность комбинации RAD1901-эверолимус в отношении лечения опухолей, слабо восприимчивых к лечению фулвестрантом, и в отношении опухолей, экспрессирующих мутантный ER α , может быть обусловлена уникальными взаимодействиями между RAD1901 и ER α . Структурные модели ER α , присоединенного к RAD1901 и другим соединениям, связывающим ER α , анализировали для получения
- 45 информации о специфичных взаимодействиях связывания (пример V). Компьютерное моделирование продемонстрировало, что взаимодействия RAD1901 - ER α , вероятно, не нарушаются мутациями в ЛСД ER α , например, мутантом Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P, на который приходится приблизительно 81,7% мутаций

ЛСД, обнаруженных в недавнем исследовании метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения (таблица 9, пример V). Таким образом, комбинация одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и

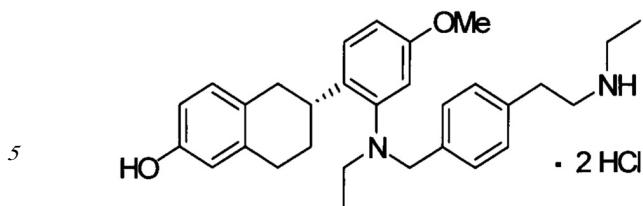
- 5 RAD1901 или его соли или сольваты (например, гидрата), вероятно, обладает терапевтическими эффектами с относительно низким уровнем побочных эффектов, аналогично комбинациям RAD1901-эверолимус, описанным в настоящей заявке. Компьютерное моделирование позволило обнаружить специфичные основания в С-концевых лиганд-связывающих доменах ER α , которые имеют определяющее значение
10 для связывания; данную информацию можно использовать для разработки соединений, которые связываются не только с ER α дикого типа, но также с определенными мутантами и вариантами указанного рецептора, которые в сочетании со вторым терапевтическим средством (например, эверолимусом) могут обеспечить мощную противоопухолевую терапию с относительно низким уровнем побочных эффектов,
15 аналогично комбинациям RAD1901-эверолимус, раскрытым в настоящей заявке.

[0079] На основании результатов, представленных в настоящей заявке, предложены способы ингибирования роста или обеспечения регрессии ER α -положительной опухоли у субъекта, который нуждается в таком ингибировании или регрессии, посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества комбинации RAD1901 или
20 сольватов (например, гидратов) или солей указанного соединения, и одного или нескольких вторых терапевтических средств, описанных в настоящей заявке (например, эверолимуса).

[0080] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения введение RAD1901 или его соли или сольваты (например, гидрата) обладает дополнительной терапевтической пользой дополнительно к ингибированию роста опухоли, включая, например, ингибирование пролиферации раковых клеток или ингибирование активности ER α (например, посредством ингибирования связывания эстрadiола или посредством деградации ER α). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения способ вызывает незначительное количество
25 отрицательных эффектов или не вызывает отрицательных эффектов в отношении тканей, отличных от тканей-мишеней (например, мышц, костей).

[0081] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его соль или сольват (например, гидрат) модулируют и/или вызывают разложение ER α и мутантного ER α .

[0082] Согласно определенным вариантам реализации в настоящей заявке представлены способы ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, способы, которые обеспечивают ингибирование роста или обеспечивают регрессию ER α -положительной опухоли у субъекта, который нуждается в таком ингибировании или регрессии, посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества комбинации RAD1901 или сольваты (например, гидрата) или соли и одного или нескольких вторых терапевтических средств, описанных в настоящей заявке. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения соль указанного соединения представляет собой дигидрохлорид RAD1901, имеющий структуру:



дигидрохлорид RAD1901.

Вторые терапевтические средства

[0083] Второе терапевтическое средство для применения в способах, представленных в настоящей заявке, может представлять собой химиотерапевтическое средство или ингибитор AKT, рецептора андрогенов, ангиогенеза, ароматазы, киназы аврора A, BCL2, EGFR, пути эстрогена, пути передачи сигналов посредством эстрогена, рецептора эстрогенов, HER2, HER3, белка теплового шока 90 (Hsp90), пути передачи сигналов посредством hedgehog (Hh), гистондеацетилазы (HDAC), путей KIT, mTOR (например, TORC1 и/или TORC2), микротрубочек, МУС, метаболизма нуклеозидов, PARP, пан-PI3K, PI3K, протеинкиназы CK2, пути RAS, фосфатазы стероидов (STS), TK, Top2A, тирозинкиназы, рецепторной тирозинкиназы VEGF или любые комбинации указанных средств. Второе терапевтическое средство может также представлять собой антитело, такое как антитело против ТФР (трансформирующего фактора роста) бета, антитело против рецептора инсулиноподобного фактора роста типа 1, антитело против антигена TROP-2, антитело против HER3, антитело против PD1 или конъюгат указанных антител с лекарственным препаратом.

[0084] Другие примеры вторых терапевтических средств включают, без ограничения, абиратерона ацетат, ADI-PEG 20, адотрастузумаб эмтанзин, афатиниб, алисертиб, анастrozол, паклитаксел и производные паклитаксела (например, ANG1005, полимерные мицеллы паклитаксела), ARN-810, азаситидин, AZD2014, AZD5363, бевацизумаб, BP-C1, бупарлисиб (BKM120), BYL719, капецитабин, карбоплатин, цедираниба малеат, цетуксимаб, цисплатин/AC4-СООР4, CR1447, CX-4945, дазатиниб, деносумаб, доцетаксел, доксорубицин, энилурацил, энтиностат, энзалутамид, эпиребуцин, эрибулин, эксеместан, эверолимус, фторурацил, фульвестврант, фрезолимумаб, ганетесипб, ганитумаб, GDC-0032, GDC-0941, гемцитабин, глембатумумаб ведотин, агонист GnRH (например, гозерелина ацетат), GRN1005, GSK 2141795, ибандронат, IMMU-132, иринотекан, иросустат, эпотилон (например, иксабепилон), лапатиниб, сонидегиб (LDE225), летрозол, LGK974, LJM716, луцитаниб, метотрексат, MK-2206, MK-3475, MLN0128, MM-302, нератиниб, нирапариб, олапариб, антиандроген (например, ортеронел), оксалиплатин, пазопаниб, пертузумаб, PF-05280014, PM01183, прогестерон, пиротиниб, ромидепсин, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, талазопариб, тамоксифен, таксан, T-DM1, телапристон (CDB-4124), темозоломид, темсиролимус, тетратиомолибдат, тезетаксел, агонист TLR 7, TPI 287, траметиниб, трастузумаб, TRC105, требананиб (AMG 386), трипторелин, велипариб, винфлюнин, винорелбин, вориностат, золадекс и золедроновую кислоту, включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных соединений.

[0085] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения вторые терапевтические средства выбраны из группы, состоящей из адотрастузумаба эмтанзина, ингибиторов киназы аврора А (например, алисертиба), ИА (например, анастrozола; эксеместана, летрозола), ARN-810, ингибиторов mTOR (например, эверолимуса, AZD2014, BEZ235, GDC-0980, CC-223, MLN0128), ингибиторов AKT (например, AZD5363, GDC-0068, GSK2110183, GSK2141795, GSK690693, MK2206), ингибиторов PI3K (например, BKM120, BYL719, GDC-0032, GDC-0941), селективных

ингибиторов гистондеацетилазы (histone deacetylase, HDAC) (например, энтиностата), агониста GnRH (например, гозерелина ацетата), GRN1005 и комбинаций указанных соединений с трастузумабом, лапатинибом, ингибитором тирозинкиназы (например, луцитанибом, нератинибом), антиандрогеном (например, ортеронелом), пертузумабом,

- 5 темозоломидом и антителами (например, кейтрудой и BYM338). [0086] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство может представлять собой ИА (например, анастрозол, аромазин, и летрозол), другой СМРЭ (например, арзоксифен, дролоксифен, EM-652 (SCH 57068), идоксифен, лазофоксифен, левормелоксифен, мипроксифен, тамоксифен и торемифен) или другой 10 CCPЭ (например, фулвестрант, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, ICI182782, RU58668, SRN-927, TAS-108 (SR16234) и ZK191703), включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных соединений.

[0087] Другие примеры вторых терапевтических средств включают, без ограничения, абраксан, AMG 386, кабазитаксел, келикс, капецитабин, доцетаксел, эрибулин,

- 15 гемцитабин, герцептин, нератиниб, пазопаниб (GW786034), рапалоги (рапамицин и его аналоги), таксол (включая аналоги/альтернативные составы), TDM1, темозоламид, тайкерб, велипариб (ABT-888) и винорелбин, включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных соединений. Второе терапевтическое средство, нацеленное на путь PI3K/AKT/mTOR

- 20 [0088] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство нацелено на путь PI3K/AKT/mTOR и может представлять собой ингибитор mTOR, двойной ингибитор mTOR, ингибитор PI3K/mTOR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство представляет собой производное рапамицина (иначе называемое рапалог),

- 25 такое как рапамицин (сиrolимус или рапамун, Pfizer), эверолимус (Афинитор или RAD001, Novartis), ридафоролимус (AP23573 или МК-8669, Merck и ARIAD Pharmaceuticals), темсиролимус (Торизел или CCI779, Pfizer), включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных соединений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство представляет

- 30 собой двойной ингибитор mTOR, который ингибирует как mTORC1, так и mTORC2, такой как MLN0128 (кастрационно-резистентный рак предстательной железы (castration-resistant prostate cancer, CRPC), Мемориальный онкологический центр им. Слоуна-Кеттеринга), CC115 и CC223 (Celgene), OSI-027 (OSI Pharmaceuticals) и AZD8055 и AZD2014 (AstraZeneca), включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных

- 35 соединений. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор PI3K/mTOR, такой как GDC-0980, SAR245409 (XL765), LY3023414 (Eli Lilly), NVP-BEZ235 (Novartis), NVP-BGT226 (Novartis), SF1126 и PKI-587 (Pfizer), включая сольваты (например, гидраты) и соли указанных соединений.

- 40 [0089] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения более чем одно второе терапевтическое средство, описанное выше, можно применять в комбинации с RAD1901 или его сольватами (например, гидратом) или солями. Например, ингибитор mTOR можно использовать вместе с другим ингибитором mTOR или с ингибитором PI3K/mTOR. Также в данной области техники известно, что вторые

- 45 терапевтические средства, описанные выше, включая ингибиторы mTOR, двойные ингибиторы mTOR и ингибиторы PI3K/mTOR, можно вводить с другими активными средствами для усиления эффективности лечения. Например, ингибитор mTOR можно применять в комбинации с ингибиторами JAK2 (Bogani et al., PLOS One, 8(1): e54826

(2013)), химиотерапевтическими средствами (Yardley, Breast Cancer (Auckl) 7: 7-22 (2013)), или вариантами эндокринной терапии, такими как тамоксифен или эксеместан (Vinayak et al., "mTOR inhibitors in the treatment of breast cancer," Oncology, опубликована 15 января 2013 года (<http://www.cancernetwork.com/breast-cancer/motor-inhibitors-treatment-breast-cancer>)).

5 Соответственно, вторые терапевтические средства также включают данные вспомогательные активные средства.

Комбинированная терапия

(1) Комбинация RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и одного или нескольких вторых терапевтических средств

10 [0090] Как RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли, так и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) при введении субъекту в монотерапии обладают терапевтическим эффектом в отношении одного или нескольких вариантов рака или опухолей (примеры I(A) и I(B)). Неожиданно было обнаружено, что RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе
15 терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) при введении в комбинации субъекту обладают в значительной степени улучшенным эффектом в отношении вариантов рака/опухолей (примеры 1(A) и 1(B)).

[0091] «Ингибиование роста» ER α -положительной опухоли в настоящей заявке может означать замедление скорости роста опухоли или полное прекращение роста
20 опухоли.

[0092] «Регрессия опухоли» или «регрессия» ER α -положительной опухоли в настоящей заявке может означать уменьшение максимального размера опухоли. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения введение комбинации одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса),
25 описанных в настоящей заявке (например, рибоциклиба, абемациклиба и эверолимуса), и RAD1901 или сольвата (например, гидрата) или соли может привести к уменьшению размера опухоли по сравнению с исходным уровнем (т.е. размером до начала лечения) или даже к устраниению или частичному устраниению опухоли. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способы регрессии опухоли, представленные в
30 настоящей заявке, можно в качестве альтернативы охарактеризовать как способы уменьшения размера опухоли по сравнению с исходным уровнем.

[0093] «Опухоль» в настоящей заявке представляет собой злокачественную опухоль и употребляется взаимозаменяя с «раком».

[0094] Ингибиование роста или регрессия опухоли могут локализоваться в одной опухоли или в ряде опухолей в пределах специфичной ткани или органа или могут являться системными (т.е. могут поражать опухоли во всех тканях или органах).

[0095] Поскольку RAD1901, как известно, предпочтительно, связывается с ER α по сравнению с рецептором эстрогенов бета (ER β), если не указано обратное, рецептор эстрогенов, рецептор эстрогенов альфа, ER α , ER, ER α дикого типа и ESR1 употребляются
40 в настоящей заявке взаимозаменяю. «Рецептор эстрогенов альфа» или «ER α » в настоящей заявке означает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность ER α дикого типа, которая кодируется геном ESR1, или состоящий или состоящий по существу из указанной аминокислотной последовательности. Опухоль, которая является «положительной в отношении рецептора эстрогенов альфа», «ER α -
45 положительной», «ER+» или «ER α +» в настоящей заявке означает опухоль, в которой одна или несколько клеток экспрессируют по меньшей мере одну изоформу ER α . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения данные клетки сверхэкспрессируют ER α . Согласно определенным вариантам реализации настоящего

изобретения пациент содержит одну или несколько клеток в опухоли, экспрессирующих одну или несколько форм ER β . Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль и/или рак связаны с раком молочной железы, матки, яичников или гипофиза. Согласно определенным из данных 5 вариантов реализации настоящего изобретения пациент имеет опухоль, расположенную в ткани молочной железы, матки, яичников или гипофиза. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых пациент имеет опухоль, расположенную в молочной железе, опухоль может быть связанной с люминальным раком молочной железы, который может являться или может не являться положительным в отношении 10 HER2, и в случае HER2+ опухолей, опухоли могут экспрессировать высокий или низкий уровень HER2 (например, фиг. 1). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения пациент имеет опухоль, расположенную в другой ткани или органе (например, костях, мышцах, головном мозге), но, тем не менее, связанную с раком молочной железы, матки, яичников или гипофиза (например, опухоли, образованные 15 в результате миграции или метастаза рака молочной железы, матки, яичников или гипофиза). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, опухоль, которая является мишенью, представляет собой метастазирующую опухоль и/или опухоль, которая характеризуется сверхэкспрессией ER в других органах 20 (например, костях и/или мышцах). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения опухоль, которая является мишенью, представляет собой опухоль и/или рак головного мозга. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения опухоль, которая является мишенью, является более чувствительной к лечению RAD1901 и вторым терапевтическим средством, как раскрыто 25 в настоящей заявке, чем к лечению другим ССРЭ (например, фулвестрантом, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ингибиторами Her2 (например, трастузумабом, лапатинибом, аботрастузумабом эмтанзином и/или пертузумабом), химиотерапией (например, абраксаном, адриамицином, карбоплатином, цитоксаном, даунорубицином, доксилом, 30 элленсоном, фторурацилом, гемзаром, хелавеном, иксемпрой, метотрексатом, митомицином, микоксантроном, навельбином, таксолом, таксоторем, тиотепой, винкристином и кселодой), ингибитором ароматазы (например, анастразолом, эксеместаном и летрозолом), селективными модуляторами рецептора эстрогенов (например, тамоксифеном, ралоксифеном, лазофоксифеном и/или торемифеном), 35 ингибитором ангиогенеза (например, бевасизумабом) и/или ритуксимабом.

[0096] Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, указанные способы также включают этап определения у пациента опухоли, экспрессирующей ER α , перед введением комбинации RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и 40 одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса).

Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, способы также включают этап определения наличия у пациента опухоли, экспрессирующей мутантный ER α , перед введением комбинации RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и 45 одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса).

Согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, указанные способы также включают этап определения наличия у пациента опухоли, экспрессирующей ER α ,

которая является восприимчивой или невосприимчивой к лечению фулвестрантом, перед введением комбинации RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса). Данные определения можно провести с применением любого способа обнаружения 5 экспрессии, известного в данной области техники, при этом их можно осуществить *in vitro* с применением образца опухоли или ткани, взятого у субъекта.

[0097] Помимо демонстрации способности RAD1901 ингибировать рост опухоли в опухолях, экспрессирующих ER α дикого типа, результаты, представленные в настоящей заявке, продемонстрировали, что RAD1901 демонстрирует неожиданную способность 10 ингибировать рост опухолей, экспрессирующих мутантную форму ER α , а именно Y537S ER α (пример 1(A)). Оценки примеров мутаций ER α методом компьютерного моделирования продемонстрировали, что ни одна из данных мутаций, как предполагают, не влияет на ЛСД или специфично не препятствует связыванию RAD1901 (пример V 15 (A)), например, ER α , содержащий один или несколько мутантов, которые выбраны из группы, состоящей из ER α с мутантным Y537X, где X представляет собой S, N или C, ER α с мутантным D538G, и ER α с мутантным S463P. На основании данных результатов в настоящей заявке представлены способы ингибирования роста или способы, 20 обеспечивающие регрессию опухоли, которая является положительной в отношении ER α , содержащего один или несколько мутантов в лиганд-связывающем домене (ЛСД), которые выбраны из группы, состоящей из Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, в особенности, Y537S ER α , у субъекта, страдающего от рака, посредством 25 введения субъекту терапевтически эффективного количества комбинации одного или нескольких одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса), и RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей. «Мутант ER α » в настоящей заявке означает ER α , с одной или несколькими заменами или 30 делециями, и варианты указанного рецептора, содержащие аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью аминокислотной последовательности ER α , или состоящие или состоящие по существу из указанной аминокислотной последовательности.

[0098] Помимо ингибирования роста опухоли рака молочной железы на ксенотрансплантатной модели на животных результаты, раскрытые в настоящей заявке, продемонстрировали, что RAD1901 демонстрирует значительное накопление в клетках опухоли и способен проникать через гематоэнцефалический барьер (пример II). Способность проникать через гематоэнцефалический барьер подтверждалася посредством демонстрации того, что введение RAD1901 в значительной степени увеличивало 35 выживаемость на ксенотрансплантатной модели метастазов головного мозга (пример I(B)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, ER α -положительная опухоль, которая является мишенью, расположена в головном мозге или в другом месте в центральной нервной системе. Согласно 40 определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль представляет собой рак, первично связанный с головным мозгом. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ER α -положительная опухоль представляет собой метастазирующую опухоль, которая 45 первично связана с другим типом рака, таким как рак молочной железы, матки, яичников

или гипофиза, или опухоль, которая мигрировала из другой ткани или органа. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой метастазы в головном мозге, такие как метастазы рака молочной железы в головном мозге (breast cancer brain metastases, BCBM). Согласно определенным 5 вариантам реализации способов, раскрытых в настоящей заявке, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли накапливаются в одной или нескольких клетках в опухоли-мишени.

[0099] Согласно определенным вариантам реализации способов, раскрытых в настоящей заявке, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли указанного 10 соединения, предпочтительно, накапливаются в опухоли при соотношении О/П (концентрация RAD1901 в опухоли/концентрация RAD1901 в плазме), составляющем приблизительно 15 или выше, приблизительно 18 или выше, приблизительно 19 или выше, приблизительно 20 или выше, приблизительно 25 или выше, приблизительно 28 или выше, приблизительно 30 или выше, приблизительно 33 или выше, приблизительно 15 35 или выше или приблизительно 40 или выше. [00100] Результаты, представленные в настоящей заявке, продемонстрировали, что введение RAD1901 защищает от атрофии костной ткани у крыс после овариоэктомии (пример IV(A)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации способов ингибиования роста опухоли или 20 регрессии опухоли, представленных в настоящей заявке, введение комбинации одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и RAD1901 или сольватов (например, гидрата) или солей не оказывает нежелательных эффектов в отношении костей, включая, например, нежелательные эффекты в отношении плотности объема костей, плотности поверхности костей, минеральной плотности 25 костей, числа трабекул, толщины трабекул, расстояния между трабекулами, плотности соединительной ткани и/или кажущейся плотности костей субъекта, который получает лечение. Поскольку тамоксифен может быть связан с атрофией костной ткани у женщин в пременопаузальном периоде, и фулвестрант может нарушать структуру костей в связи 30 с механизмом действия данного средства, комбинация одного или нескольких одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей может быть наиболее полезной для женщин в пременопаузальном периоде, лечения опухолей, устойчивых к тамоксифену или антиэстрогеновой терапии, и для пациентов, страдающих от остеопороза или подверженных высокому риску остеопороза.

[00101] Результаты, представленные в настоящей заявке, продемонстрировали, что 35 RAD1901 выступал антагонистом стимуляции эстрadiолом тканей матки у крыс после овариоэктомии (пример IV(A)). Более того, у субъектов-людей, получавших лечение RAD1901 в ежедневной дозе 200 мг или до 500 мг, почти не наблюдалось изменений сигналов стандартизированного объема накопления (СУН) для тканей матки, мышц и костей, которые по существу не экспрессировали ER, до и после лечения (пример III 40 (A)). Соответственно, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения такое введение также не приводит к нежелательным эффектам в отношении других тканей, включая, например, ткани матки, мышц или молочной железы.

[00102] RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе 45 терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) вводят в комбинации субъекту, который нуждается в таком введении. Фраза «в комбинации» означает, что RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли можно вводить до, в течение или после введения второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса). Например, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и

второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) можно вводить с интервалом приблизительно одну неделю, с интервалом приблизительно 6 дней, с интервалом приблизительно 5 дней, с интервалом приблизительно 4 дня, с интервалом приблизительно 3 дня, с интервалом приблизительно 2 дня, с интервалом приблизительно 5

5 24 часа, с интервалом приблизительно 23 часа, с интервалом приблизительно 22 часа, с интервалом приблизительно 21 час, с интервалом приблизительно 20 часов, с интервалом приблизительно 19 часов, с интервалом приблизительно 18 часов, с интервалом приблизительно 17 часов, с интервалом приблизительно 16 часов, с интервалом приблизительно 15 часов, с интервалом приблизительно 14 часов, с

10 интервалом приблизительно 13 часов, с интервалом приблизительно 12 часов, с интервалом приблизительно 11 часов, с интервалом приблизительно 10 часов, с интервалом приблизительно 9 часов, с интервалом приблизительно 8 часов, с интервалом приблизительно 7 часов, с интервалом приблизительно 6 часов, с интервалом приблизительно 5 часов, с интервалом приблизительно 4 часа, с интервалом

15 приблизительно 3 часа, с интервалом приблизительно 2 часа, с интервалом приблизительно 1 час, с интервалом приблизительно 55 минут, с интервалом приблизительно 50 минут, с интервалом приблизительно 45 минут, с интервалом приблизительно 40 минут, с интервалом приблизительно 35 минут, с интервалом приблизительно 30 минут, с интервалом приблизительно 25 минут, с интервалом

20 приблизительно 20 минут, с интервалом приблизительно 15 минут, с интервалом приблизительно 10 минут или с интервалом приблизительно 5 минут. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) вводят субъекту одновременно или по существу одновременно. Согласно определенным

25 из данных вариантов реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) можно вводить в качестве части одного состава.

[00103] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят комбинацию RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и одно

30 второе терапевтическое средство (например, эверолимус). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения субъекту вводят комбинацию RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и более одного второго терапевтического средства (например, эверолимус). Например, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли можно сочетать с двумя или более вторыми терапевтическими

35 средствами (например, эверолимусом) для лечения вариантов рака/опухолей. (2) Доза

[00104] Терапевтически эффективное количество комбинации RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) для применения в способах, раскрытых в настоящей заявке, представляет собой количество, которое при введении

40 в течение определенного периода времени приводит к достижению одного или нескольких терапевтических сравнительных критериев (например, замедления или прекращения роста опухоли, которое приводит к регрессии опухоли, прекращения симптомов и т.д.). Комбинацию для применения в способах, раскрытых в настоящей заявке, можно вводить субъекту один раз или несколько раз. Согласно вариантам

45 реализации настоящего изобретения, в которых соединения вводят несколько раз, данные соединения можно вводить с заданным интервалом, например, ежедневно, через день, еженедельно или ежемесячно. В качестве альтернативы, данные соединения можно вводить с нерегулярными интервалами, например, по мере необходимости в

зависимости от симптомов, здоровья пациента и т.п. Терапевтически эффективное количество комбинации можно вводить ежедневно в течение одного дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 10 дней или по

5 меньшей мере 15 дней. Необязательно статус рака или регрессию опухоли контролируют в течение или после лечения, например, посредством сканирования субъекта методом ФЭС-ПЭТ. Дозу комбинации, которую вводят субъекту, можно увеличить или уменьшить в зависимости от установленного статуса рака или регрессии опухоли.

[00105] В идеальном случае терапевтически эффективное количество не превышает

10 максимально переносимую дозу, при которой 50% или более субъектов, получающих лечение, испытывают тошноту или другие реакции токсичности, которые предотвращают последующие введения лекарственных препаратов. Терапевтически эффективное количество для субъекта может варьировать в зависимости от множества факторов, включая множество и степень симптомов, пол, возраст, массу тела или общее состояние 15 здоровья субъекта, способ введения и тип соли или сольватата, различия в восприимчивости к лекарственному препарату, конкретный тип заболевания и т.п.

[00106] Примеры терапевтически эффективных количеств RAD1901 или сольватов (например, гидрата) или солей указанного соединения для применения в способах, раскрытых в настоящей заявке, включают, без ограничения, ежедневные дозы от

20 приблизительно 150 до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 1500 мг или от приблизительно 300 до приблизительно 1500 мг в случае субъектов, которые страдают от устойчивых ER-зависимых опухолей или вариантов рака; ежедневные дозы от приблизительно 150 до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 200 до

25 приблизительно 1000 мг или от приблизительно 250 до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 300 до приблизительно 1000 мг в случае субъектов, которые страдают от ER дикого типа-зависимых опухолей и/или вариантов рака и устойчивых опухолей и/или вариантов рака; и ежедневные дозы от приблизительно 300 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 до

30 приблизительно 600 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 250 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 150 до приблизительно 500 мг, от

35 приблизительно 150 до приблизительно 550 мг или от приблизительно 150 до приблизительно 600 мг в случае субъектов, страдающих от, в большинстве своем, ER дикого типа-зависимых опухолей и/или вариантов рака.

[00107] Терапевтически эффективное количество или доза второго терапевтического средства (например, эверолимуса) зависит от конкретного типа указанного средства.

40 Как правило, ежедневная доза второго терапевтического средства (например, эверолимуса) варьирует от приблизительно 1 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 1200 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 1 мг до

45 приблизительно 500 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 30 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 20 мг, от приблизительно 1 мг до

приблизительно 10 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 1200 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 300 мг до

5 приблизительно 600 мг, от приблизительно 350 мг до приблизительно 500 мг. Ежедневная доза второго терапевтического средства (например, эверолимуса) может варьировать от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 75 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от

10 приблизительно 1 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг, от

15 приблизительно 2 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 75 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 40 мг/кг, от

20 приблизительно 2 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 75 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 45 мг/кг, от

25 приблизительно 2,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 2,5 до приблизительно 10 мг/кг.

[00108] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в терапевтически эффективном количестве комбинации можно использовать

25 терапевтически эффективное количество любого соединения, вводимого в монотерапии. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения в связи со значительно улучшенным синергическим терапевтическим эффектом, который обеспечивает комбинация, терапевтически эффективные количества RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и второго терапевтического средства или средств

30 (например, эверолимуса) при введении в комбинации могут являться меньшими, чем терапевтически эффективные количества RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса), требуемые при введении в монотерапии; и одно или оба соединения можно вводить в дозе, меньшей, чем доза, при которой данные соединения будут в норме вводить при

35 раздельном введении. Не опираясь на какую-либо конкретную теорию, считают, что комбинированная терапия обеспечивает значительно улучшенный эффект посредством уменьшения дозы по меньшей мере одного или всех RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса), посредством этого устранивая или облегчая нежелательные

40 токсичные побочные эффекты.

[00109] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей при введении в качестве части комбинации составляет от приблизительно 30% до приблизительно 200%, от приблизительно 40% до приблизительно 200%, от

45 приблизительно 50% до приблизительно 200%, от приблизительно 60% до приблизительно 200%, от приблизительно 70% до приблизительно 200%, от приблизительно 80% до приблизительно 200%, от приблизительно 90% до приблизительно 200%, от приблизительно 100% до приблизительно 200%, от 30% до

- приблизительно 150%, от приблизительно 40% до приблизительно 150%, от приблизительно 50% до приблизительно 150%, от приблизительно 60% до приблизительно 150%, от приблизительно 70% до приблизительно 150%, от приблизительно 80% до приблизительно 150%, от приблизительно 90% до
- 5 приблизительно 150%, от приблизительно 100% до приблизительно 150%, от приблизительно 30% до приблизительно 120%, от приблизительно 40% до приблизительно 120%, от приблизительно 50% до приблизительно 120%, от приблизительно 60% до приблизительно 120%, от приблизительно 70% до приблизительно 120%, от приблизительно 80% до приблизительно 120%, от
- 10 приблизительно 90% до приблизительно 120%, от приблизительно 100% до приблизительно 120%, от 30% до приблизительно 110%, от приблизительно 40% до приблизительно 110%, от приблизительно 50% до приблизительно 110%, от приблизительно 60% до приблизительно 110%, от приблизительно 70% до приблизительно 110%, от приблизительно 80% до приблизительно 110%, от
- 15 приблизительно 90% до приблизительно 110% или от приблизительно 100% до приблизительно 110% от терапевтически эффективного количества RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей при введении в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса)
- 20 при введении в качестве части комбинации составляет от приблизительно 30% до приблизительно 200%, от приблизительно 40% до приблизительно 200%, от приблизительно 50% до приблизительно 200%, от приблизительно 60% до приблизительно 200%, от приблизительно 70% до приблизительно 200%, от приблизительно 80% до приблизительно 200%, от приблизительно 90% до
- 25 приблизительно 200%, от приблизительно 100% до приблизительно 200%, от 30% до приблизительно 150%, от приблизительно 40% до приблизительно 150%, от приблизительно 50% до приблизительно 150%, от приблизительно 60% до приблизительно 150%, от приблизительно 70% до приблизительно 150%, от приблизительно 80% до приблизительно 150%, от приблизительно 90% до
- 30 приблизительно 150%, от приблизительно 100% до приблизительно 150%, от приблизительно 30% до приблизительно 120%, от приблизительно 40% до приблизительно 120%, от приблизительно 50% до приблизительно 120%, от приблизительно 60% до приблизительно 120%, от приблизительно 70% до приблизительно 120%, от приблизительно 80% до приблизительно 120%, от
- 35 приблизительно 90% до приблизительно 120%, от приблизительно 100% до приблизительно 120%, от 30% до приблизительно 110%, от приблизительно 40% до приблизительно 110%, от приблизительно 50% до приблизительно 110%, от приблизительно 60% до приблизительно 110%, от приблизительно 70% до приблизительно 110%, от приблизительно 80% до приблизительно 110%, от
- 40 приблизительно 90% до приблизительно 110% или от приблизительно 100% до приблизительно 110% от терапевтически эффективного количества второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса) при введении в монотерапии.
- [00110] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения
- 45 варианты рака или опухоли являются устойчивыми ER-зависимыми вариантами рака или опухолями (например, содержащими мутантные домены связывания ER (например, ER α , с одной или несколькими мутациями, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет

собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и комбинации указанных мутаций), варианты рака или опухоли, сверхэкспрессирующие ER, или случаи, в которых пролиферация опухоли и/или рака становится лиганд-независимой, или опухоли и/или варианты рака, которые прогрессируют при лечении другим ССРЭ (например,

- 5 фулвестрантом, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496), ингибиторами Her2 (например, трастузумабом, лапатинибом, аботрастузумабом эмтанзином и/или пертузумабом), химиотерапией (например, абраксаном, адриамицином, карбоплатином, цитоксаном, даунорубицином, доксилом, элленсом, фторурацилом, гемзаром, хелавеном, иксемпрой, метотрексатом,
- 10 митомицином, микоксанtronом, навельбином, таксолом, таксоторем, тиотепой, винкристином и кселодой), ингибитором ароматазы (например, анастразолом, эксеместаном и летрозолом), селективными модуляторами рецептора эстрогенов (например, тамоксифеном, ралоксифеном, лазофоксифеном и/или торемифеном), ингибитором ангиогенеза (например, бевацизумабом) и/или ритуксимабом.

- 15 [00111] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения доза RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей в комбинации с вторым терапевтическим средством (например, эверолимусом), описанным в настоящей заявке (например, рибоциклибом, абемациклибом и эверолимусом), для применения в способах, раскрытых в настоящей заявке, общепринятая для взрослого субъекта, может составлять
- 20 от приблизительно 30 мкг до 2000 мг, от 100 мкг до 1500 мг или от 150 мг до 1500 мг в день посредством перорального введения. Данной ежедневной дозы можно достичь посредством однократного введения или нескольких введений.

- [00112] Комбинацию одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей можно вводить субъекту один раз или несколько раз. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых соединения вводят несколько раз, данные соединения можно вводить с заданным интервалом, например, ежедневно, через день, еженедельно или ежемесячно. В качестве альтернативы, данные соединения можно вводить с нерегулярными интервалами, например, по мере необходимости в зависимости от симптомов, здоровья пациента и т.п.

(3) Состав

- [00113] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) вводят в отдельных составах. Согласно определенным из данных вариантов реализации настоящего изобретения составы могут относиться к одному типу. Например, оба состава могут быть разработаны для перорального введения (например, посредством двух отдельных драже) или для инъекции (например, посредством двух отдельных инъекционных составов). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) могут быть приготовлены в состав в различных типах составов. Например, одно соединение может находиться в составе, разработанном для перорального введения, в то время как другое находится в составе, разработанном для инъекции.

- [00114] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус), описанные в настоящей заявке, вводят в качестве части единого состава. Например, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус)

приготовлены в состав в одном драже для перорального введения или в разовой дозе для инъекции. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящей заявке предложены комбинированные составы, содержащие RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и одно или несколько вторых терапевтических 5 средств (например, эверолимус). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения введение соединений в одном составе улучшает соблюдение больным режима и схемы лечения.

[00115] Терапевтически эффективное количество каждого соединения при введении в комбинации может являться меньшим, чем терапевтически эффективное количество 10 каждого соединения, вводимого в монотерапии.

[00116] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения состав, содержащий RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли, одно или несколько вторых терапевтических средств (например, эверолимус) или как RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли, так и одно или несколько вторых терапевтических 15 средств (например, эверолимус), может также содержать одно или несколько фармацевтических вспомогательных веществ, носителей, вспомогательных средств и/или консервантов.

[00117] RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) для применения в 20 способах, раскрытых в настоящей заявке, можно приготовить в состав в единичных лекарственных формах, которые означают физически обособленные единицы, подходящие в качестве однократных доз для субъектов, лечение которых проводят, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, необязательно в 25 сочетании с подходящим фармацевтическим носителем. Единичная дозированная форма может предназначаться для однократной ежедневной дозы или одной из множества ежедневных доз (например, приблизительно от 1 до 4 или более раз в день). Когда используют несколько ежедневных доз, единичная дозированная форма для каждой дозы может являться одинаковой или разной. Согласно определенным вариантам 30 реализации настоящего изобретения соединения могут быть приготовлены в состав для контролируемого высвобождения.

[00118] Состав RAD1901 или его сольвата (например, гидрат) или соли и второго терапевтического средства или средства (например, эверолимус) для применения в описанных в настоящем изобретении способах можно приготовить согласно любому 35 доступному общепринятым способу. Примеры предпочтительных лекарственных форм включают таблетку, порошок, измельченную гранулу, гранулу, покрытую таблетку, капсулу, сироп, пастилку, лекарственную форму для ингаляции, суппозиторий, инъекционное вещество, мазь, офтальмологическую мазь, глазные капли, назальные капли, ушные капли, горячий компресс, лосьон и т.п. В составе можно использовать 40 обычно применяемые добавки, такие как разбавитель, связывающее вещество, разрыхляющее вещество, смазывающее вещество, красящее вещество, ароматизирующее вещество и, в случае необходимости, стабилизатор, эмульгирующее вещество, вещество, способствующее всасыванию, поверхностно-активное вещество, регулятор pH, антисептическое вещество, антиоксидант и т.п. Помимо этого, приготовление в состав 45 также проводят посредством объединения композиций, которые, как правило, используют в качестве исходного материала для приготовления фармацевтических составов согласно общепринятым способам. Примеры данных композиций включают, например, (1) масло, такое как соевое масло, говяжье сало и синтетический глицерид;

(2) углеводород, такой как жидкий парафин, сквалан и твердый парафин; (3) сложноэфирное масло, такое как октилдодецил миристиновая кислота и изопропил миристиновая кислота; (4) высший спирт, такой как цетостеариловый спирт и бегениловый спирт; (5) кремнийорганическую смолу; (6) кремнийорганическое масло;

5 (7) поверхностно-активное вещество, такое как полиоксиэтиленовый эфир жирной кислоты, сорбитановый эфир жирной кислоты, глицериновый эфир жирной кислоты, полиоксиэтиленовый сорбитановый эфир жирной кислоты, твердое полиоксиэтиленовое касторовое масло и полиоксиэтиленовый полигидроксипропиленовый блок-сополимер; (8) водорастворимую макромолекулу, такую как гидроксиэтилцеллюзоза, полиакриловая

10 кислота, карбоксивиниловый полимер, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и метилцеллюзоза; (9) низший спирт, такой как этанол и изопропанол; (10) многовалентный спирт, такой как глицерин, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и сорбитол; (11) сахар, такой как глюкоза и тростниковый сахар; (12) неорганический порошок, такой как безводная кремниевая кислота, магний-алюминий силикат и силикат

15 алюминия; (13) очищенную воду и т.п. Добавки для применения в вышеуказанных составах могут включать в качестве разбавителя, например, 1) лактозу, кукурузный крахмал, сахарозу, глюкозу, маннитол, сорбитол, кристаллическую целлюзозу, диоксид кремния; 2) в качестве связывающего вещества - поливиниловый спирт, поливиниловый эфир, метилцеллюзозу, этилцеллюзозу, аравийскую камедь, трагакантовую камедь,

20 желатин, шеллак, гидроксипропилцеллюзозу, гидроксипропилметилцеллюзозу, поливинилпирролидон, блок-сополимер полипропиленгликоль-полиоксиэтилен, меглумин, цитрат кальция, декстрин, пектин и т.п.; 3) в качестве разрыхлителей - крахмал, agar, желатиновый порошок, кристаллическую целлюзозу, карбонат кальция, бикарбонат натрия, цитрат кальция, декстрин, пектин, карбоксиметилцеллюзозу/кальций

25 и т.п.; 4) в качестве смазывающего вещества -стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль, диоксид кремния, гидрогенированное растительное масло и т.п.; 5) любые красители, добавление которых является фармацевтически приемлемым, являются подходящими в качестве красителей; 6) в качестве ароматизирующего вещества - какао-порошок, ментол, ароматизатор, масло перечной мяты, порошок корицы; 7) антиоксиданты,

30 добавление которых является фармацевтически приемлемым, такие как аскорбиновая кислота или альфа-тофенол.

[00119] RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и одно или несколько вторых терапевтических средств (например, эверолимус) для применения в раскрытых в настоящей заявке способах можно приготовить в состав в фармацевтической

35 композиции в виде любого одного или нескольких из активных соединений, описанных в настоящей заявке, и физиологически приемлемого носителя (также обозначаемый фармацевтически приемлемый носитель или раствор, или разбавитель). Такие носители и растворы включают фармацевтически приемлемые соли и сольваты соединений, используемые в способах согласно настоящему изобретению, и смеси, содержащие два

40 или более таких соединений, фармацевтически приемлемые соли соединений и фармацевтически приемлемые сольваты соединений. Такие композиции получают в соответствии с приемлемыми фармацевтическими процедурами, описанными в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Printing Company, Eaton, Pa. (1990), которое включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[00120] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает носитель, который не вызывает аллергической реакции или другого нежелательного эффекта в отношении пациентов, которым его вводят, и является совместимым с другими компонентами в

составе. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, фармацевтические разбавители, вспомогательные вещества или носители, соответствующим способом выбранные в соответствии с предполагаемой формой введения и с учетом общепринятых фармацевтических практик. Например, твердые носители/разбавители включают, но

- 5 не ограничиваются ими, камедь, крахмал (например, кукурузный крахмал, прежелатинизированный крахмал), сахар (например, лактозу, маннитол, сахарозу, декстрозу), целлюлозное вещество (например, микрокристаллическую целлюлозу), акрилат (например, полиметилакрилат), карбонат кальция, оксид магния, тальк или смеси указанных веществ. Фармацевтически приемлемые носители могут также включать
- 10 незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности или эффективность терапевтического средства.

[00121] Одно или несколько вторых терапевтических средств (например, эверолимус) и RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли в свободной форме могут

- 15 превращаться в соль общепринятыми способами. Термин «соль», используемый в настоящей заявке, не ограничен, при условии, что соль образована с RAD1901 или его сольватами (например, гидратом) или солями и является фармакологически приемлемой; предпочтительные примеры солей включают галоидоводородную соль (например, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид и т.п.), неорганическую кислую соль (например,
- 20 сульфат, нитрат, перхлорат, фосфат, карбонат, бикарбонат и т.п.), органическую карбоксилатную соль (например, ацетатную соль, малатную соль, тартратную соль, фумаратную соль, цитратную соль и т.п.), органическую сульфонатную соль (например, метансульфонатную соль, этансульфонатную соль, бензолсульфонатную соль, толуенсульфонатную соль, камфорсульфонатную соль и т.п.), соль аминокислоты
- 25 (например, аспартатную соль, глутаматную соль и т.п.), четвертичную аммониевую соль, соль щелочного металла (например, натриевую соль, калиевую соль и т.п.), соль щелочноземельного металла (магниевую соль, кальциевую соль и т.п.) и т.п. Помимо этого, гидрохлоридная соль, сульфатная соль, метансульфонатная соль, ацетатная соль и т.п. являются предпочтительными в качестве «фармакологически приемлемых солей»
- 30 соединения согласно настоящему изобретению.

[00122] Изомеры RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и/или второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса) (например, геометрические изомеры, оптические изомеры, ротамеры, таутомеры и т.п.), можно очистить с применением общеизвестных средств разделения, включая, например,

- 35 перекристаллизацию, оптическое разрешение, такое как метод на основе диастереомерной соли, метод фракционирования ферментов, различные варианты хроматографии (например, тонкослойная хроматография, колоночная хроматография, хроматография на стекле и т.п.) с получением отдельного изомера. Термин «отдельный изомер» в настоящей заявке включает не только изомер, который характеризуется
- 40 чистотой 100%, но также изомер, содержащий изомер, отличный от целевого, который существует даже после общепринятого процесса очистки. Иногда существует кристаллический полиморф RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и/или второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса), и все кристаллические полиморфы указанного соединения включены в настоящее изобретение.
- 45 Кристаллический полиморф иногда является отдельным, а иногда представляет собой смесь, и оба указанных варианта включены в настоящую заявку.

[00123] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и/или второе терапевтическое

средство или средства (например, эверолимус) могут находиться в форме пролекарства; это означает, что данное соединение должно подвергнуться некоторому изменению (например, окислению или гидролизу) для достижения своей активной формы. В качестве альтернативы, RAD1901 или его сольваты (например, гидрат) или соли и/или второе

5 терапевтическое средство или средства (например, эверолимус) может представлять собой соединение, полученное посредством преобразования родительского пролекарства в его активную форму.

(4) Способ введения

[00124] Способы введения RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей

10 и/или второго терапевтического средства или средств (например, эверолимуса) включают, но не ограничиваются ими, местное введение, пероральное введение, внутрикожное введение, внутримышечное введение, интраперитонеальное введение, внутривенное введение, внутривазальную инфузию, под кожное введение, трансдермальное введение и чресслизистое введение.

15 (5) Профилирование генов

[00125] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения способы ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленные в настоящей заявке, также включают профилирование гена субъекта, причем ген, профиль которого получают, представляет собой один или несколько генов, которые выбраны из группы, состоящей из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEBPA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RBI, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL.

[00126] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения второе

30 средство представляет собой эверолимус, и у субъектов присутствуют соматические мутации в TSC1.

[00127] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения субпопуляции пациентов, страдающих от рака молочной железы, причем указанная субпопуляция характеризуется увеличенной экспрессией одного или нескольких из следующих генов, и лечение указанной субпопуляции эффективной дозой комбинации RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса), описанных в настоящей заявке, согласно вариантам реализации введения доз, описанным в настоящем изобретении. (6) Корректировка дозы

35 [00128] Помимо установления способности RAD1901 ингибировать рост опухоли результаты, представленные в настоящей заявке, продемонстрировали, что RAD1901 ингибирует связывание эстрadiола с ER в матке и гипофизе (пример III(A)). В данных экспериментах связывание эстрadiола с ER в ткани матки и гипофиза оценивали посредством визуализации ФЭС-ПЭТ. После лечения RAD1901 наблюдаемый уровень 40 связывания ER находился на фоновых уровнях или ниже фоновых уровней. Данные результаты позволили установить, что антагонистический эффект RAD1901 в отношении активности ER можно оценивать с применением сканирования в реальном времени. На 45 основании данных результатов в настоящей заявке представлены способы мониторинга

эффективности лечения RAD1901 или сольватами (например, гидратом) или солями указанного соединения в комбинированной терапии, раскрытой в настоящей заявке, посредством измерения связывания эстрадиола с ER в одной или нескольких тканях-мишениях, причем уменьшение или исчезновение связывания означает эффективность.

- 5 [00129] Также предложены способы корректировки дозы RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей в комбинированной терапии, раскрытой в настоящей заявке, на основании связывания эстрадиола с ER. Согласно определенным вариантам реализации данных способов связывание измеряют в определенной точке после одного или нескольких введений первой дозы соединения. Если воздействие на связывание
- 10 эстрадиола с ER отсутствует или демонстрирует уменьшение ниже заранее определенного порога (например, уменьшение связывания по сравнению с исходным уровнем составляет менее 5%, менее 10%, менее 20%, менее 30% или менее 50%), первую дозу считают слишком низкой. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения данные способы включают дополнительный этап введения увеличенной
- 15 второй дозы соединения. Данные этапы можно повторить с дозой, которую периодически увеличивают до достижения желаемого уменьшения связывания эстрадиола с ER. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения данные этапы можно включить в способы ингибиования роста опухоли, представленные в настоящей заявке. В данных способах связывание эстрадиола с ER
- 20 может выступать в качестве посредника для ингибиования роста опухоли или в качестве дополнительного средства оценки ингибиования роста. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения данные способы можно использовать в сочетании с введением RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей для целей, отличных от ингибиования роста опухоли, включая, например, ингибиование
- 25 пролиферации раковых клеток.

[00130] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящей заявке представлены способы корректировки дозы RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей в комбинированной терапии, причем указанный способ включает:

- 30 (1) введение первой дозы RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей (например, от приблизительно 350 до приблизительно 500 мг/день) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней;
- (2) обнаружение активности связывания эстрадиола с ER, например, с применением визуализации ФЭС-ПЭТ, как раскрыто в настоящей заявке; причем:
 - 35 (i) если активность связывания ER является необнаруживаемой или находится ниже уровня заранее определенного порога, продолжение введения первой дозы (т.е. сохранение уровня дозы); или
 - (ii) если активность связывания ER является обнаруживаемой или находится выше уровня заранее определенного порога, введение второй дозы, которая является большей, чем первая доза (например, первая доза плюс от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней, затем переход к этапу (3);
- (3) обнаружение активности связывания эстрадиола с ER, например, с применением визуализации ФЭС-ПЭТ, как раскрыто в настоящей заявке; причем
 - 40 (i) если активность связывания ER является необнаруживаемой или находится ниже уровня заранее определенного порога, продолжение введения второй дозы (т.е. сохранение уровня дозы); или
 - (ii) если активность связывания ER является обнаруживаемой или находится выше уровня заранее определенного порога, введение третьей дозы, которая является большей,

чем вторая доза (например, второй дозы плюс от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 дней, затем переход к этапу (4);

(4) повторение вышеуказанных этапов с использованием четвертой дозы, пятой дозы и т.д. до тех пор, пока не будет обнаруживаться какая-либо активность связывания ER.

[00131] Согласно определенным вариантам реализации настоящее изобретение включает применение визуализации ПЭТ для обнаружения и/или лечения дозами вариантов рака, чувствительных к ER или устойчивых к ER.

(7) Комбинации для способов, раскрытых в настоящем изобретении

[00132] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к

10 фармацевтической композиции, содержащей один или несколько RAD1901 или его сольватов (например, гидрата) или солей и/или второе терапевтическое средство или средства (например, эверолимус), раскрытое в настоящей заявке, в терапевтически эффективном количестве, как раскрыто в настоящей заявке, для комбинированных способов, изложенных в настоящей заявке.

15 Взаимодействия RAD1901-ER α

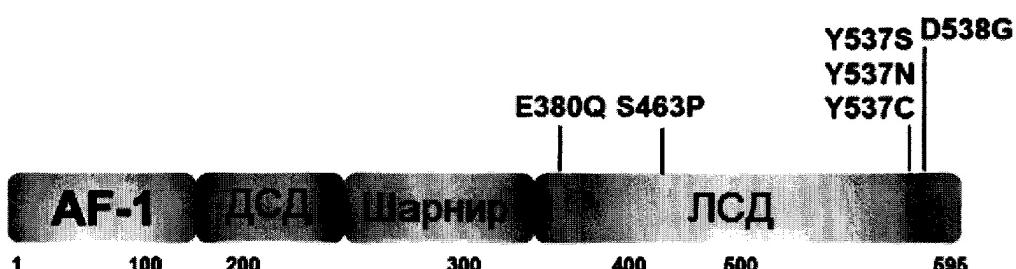
(1) Мутантный ER α в ER-положительных образцах опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения

20 [00133] В пяти исследованиях, о которых сообщалось в последние два года, секвенировали в совокупности 187 метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения, и у 39 пациентов (21%) были обнаружены мутации ЛСД ER (Jeselsohn). Шесть наиболее частых мутаций ЛСД среди 39 пациентов показаны на схеме 1 по материалам публикации Jeselsohn.

Рецептор эстрогенов

25

30



35 Схема 1. Расположение иллюстративных мутаций ER α и их частота

[00134] Частота всех мутаций ЛСД обобщена в таблице 9.

[00135] Компьютерное моделирование продемонстрировало, что взаимодействия RAD1901-ER α , вероятно, не нарушаются у мутантов ЛСД ER α , например, у мутанта Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P, на который приходится приблизительно 81,7% мутаций ЛСД, обнаруженных в недавнем исследовании 40 метастазирующих ER-положительных образцов опухоли молочной железы от пациентов, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения (таблица 10, пример V).

45

[00136] В настоящей заявке представлены комплексы и кристаллы RAD1901, присоединенного к ER α и/или мутантному ER α , причем мутантный ER α содержит одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, и их комбинации.

[00137] Согласно определенным вариантам реализации способов, представленных в настоящей заявке, ЛСД ER α и мутантный ER α содержит AF-2. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД содержит аминокислоты 299-554 ER α или состоит или состоит по существу из указанных аминокислот. Согласно 5 определенным вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД мутантного ER α содержит одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, и комбинации указанных вариантов. Термин «и/или» в настоящей заявке включает как случай «и», так и случай «или».

[00138] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящей заявке представлены способы лечения состояния, связанного с активностью или экспрессией ER α и/или мутантного ER α у субъекта, который нуждается в таком лечении, причем указанные способы включают введение субъекту комбинации одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и одного или 15 нескольких соединений, способных к связыванию с ER α и/или мутантным ER α посредством ЛСД. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения субъект представляет собой млекопитающее, и согласно определенным из данных вариантов реализации указанный субъект представляет собой человека. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения состояние 20 представляет собой опухоль и/или рак, включая, но не ограничиваясь ими, ER положительную опухоль и/или рак, как описано в настоящей заявке.

[00139] Согласно определенным вариантам реализации соединений и способов, представленных в настоящей заявке, ЛСД ER α и мутантного ER α содержит AF-2. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД содержит 25 аминокислоты 299-554 ER α или состоит или состоит по существу из указанных аминокислот. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения ЛСД мутантного ER α содержит одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь ими, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, и их комбинации.

[00140] Согласно определенным вариантам реализации соединений и способов, представленных в настоящей заявке, соединение, способное к связыванию с ER α и/или мутантным ER α посредством ЛСД, представляет собой селективный супрессор рецептора эстрогенов (CCРЭ) или селективный модулятор рецептора эстрогенов 35 (СМРЭ). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения соединение, способное к связыванию с ER α и/или мутантным ER α посредством ЛСД, осуществляет данное связывание посредством одного или нескольких взаимодействий, которые выбраны из группы, состоящей из взаимодействий водородной связи с остатками E353, D351, R349 и/или L536 и пи-взаимодействий с остатком F404 ER α и/или 40 мутантного ER α . Примером такого соединения является RAD1901.

[00141] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения в настоящей заявке представлены способы лечения состояния, связанного с активностью или экспрессией мутантного ER α , содержащего одну или несколько мутаций, включая, но не ограничиваясь указанными, Y537X₁, где X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, где X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, причем указанный способ включает введение субъекту комбинации одного или нескольких вторых терапевтических средств (например, эверолимуса) и одного или нескольких соединений, способных к связыванию с ER α посредством ЛСД. Согласно 45

определенным вариантам реализации настоящего изобретения состояние представляет собой рак, включая, но не ограничиваясь ими, ER положительный рак, рак молочной железы, ER положительный рак молочной железы и метастазирующий рак молочной железы, и согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения соединение представляет собой RAD1901 или его фармацевтически приемлемый сольват (например, гидрат) или фармацевтически приемлемую соль.

[00142] Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. В тех случаях, когда упоминаются конкретные материалы, данные

упоминания приведены исключительно для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные способы или реактивы без приложения изобретательских усилий и не выходя за пределы объема настоящего изобретения. Следует понимать, что в процедуры, описанные в настоящей заявке, могут быть внесены многочисленные вариации без отклонения от объема настоящего изобретения. Авторы настоящего изобретения считают, что такие вариации включены в объем настоящего изобретения.

Примеры

Материалы и методы

Исследуемые соединения

[00143] RAD1901, использованный в примерах ниже, представляет собой дигидрохлорид (6R)-6-(2-(N-(4-(2-(этиламино)этил)бензил)-N-этиламино)-4-метоксифенил)-5,6,7,8-тетрагидрофтален-2-ола, произведенный компанией IRIX Pharmaceuticals, Inc. (Флоренция, Южная Каролина). RAD1901 хранили в виде сухого порошка, приготовленного в состав для применения в виде гомогенной суспензии в 0,5% (масс/об.) метилцеллулозы в деионизированной воде, и в случае моделей на животных вводили через желудочный зонд. Тамоксифен, ралоксифен и эстрadiол (E2) получали в компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури), и вводили посредством подкожной инъекции. Фулвестрант получали в компании Tocris Biosciences (Миннеаполис, Миннесота) и вводили посредством подкожной инъекции. Другие лабораторные реактивы заказывали в компании Sigma-Aldrich, если не указано обратное.

Линии клеток

[00144] Клетки MCF-7 (метастазирующей аденокарциномы молочной железы человека) заказывали в Американской коллекции типовых клеточных культур (Роквилл, Мэриленд) и общепринятым способом поддерживали в не содержащей феноловый красный минимальной питательной среде (minimal essential medium, MEM), содержащей 2 mM L-глутамина и CCP (сбалансированный солевой раствор) Эрла, 0,1 mM заменимых аминокислот и 1 mM пирувата натрия с добавлением 0,01 мг/мл инсулина быка и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) при содержании CO₂ 5%.

[00145] Клетки T47D культивировали в CO₂-инкубаторе при содержании CO₂ 5% в чашках размером 10 см до конфлюэнтности, составляющей приблизительно 75%, в среде роста RPMI с добавлением 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки) и 5 мкг/мл инсулина человека.

Ксенотрансплантатные модели *in vivo*

[00146] Всех мышей содержали в стерильных условиях в индивидуально вентилируемых клетках со стерилизованным и не содержащим пыли наполнителем, с доступом к стерилизованной пище и воде без ограничения, при цикле темноты/света (циркадный цикл искусственного света 12-14 часов) и при контролируемой комнатной

температуре и влажности. Опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля с нониусом, и объемы рассчитывали с применением формулы: $(L \cdot W^2) \cdot 0,52$.

PDx модели

[00147] Некоторые примеры полученных от пациентов ксенотранспланатных моделей (PDx моделей) показаны на фиг. 1. PDx модели с полученной от пациента опухолью рака молочной железы устанавливали из жизнеспособной ткани опухоли человека или жидкости, которую перевивали сериями в животных (бестимусные мыши (Nu (NCF)-Foxn 1 nu)) ограниченное количество раз для поддержания гетерогенности опухоли. Перед проведением исследования регистрировали объемы опухолей для каждого эксперимента, начиная приблизительно за одну неделю до предполагаемой даты начала. Когда опухоли достигали соответствующего диапазона исходного объема опухоли (ИОО) ($150-250 \text{ mm}^3$), животных рандомизировали на группы лечения и контроля и начинали введение доз (день 0,8-10 субъектов в каждой группе); животных во всех исследованиях отслеживали индивидуально в течение всего эксперимента. Изначальное введение доз начинали в день 0; животным во всех группах вводили дозы по массе (0,01 мл на грамм; 10 мл/кг). Каждая группа получала лечение наполнителем (контроль, п.о./о.р.д. до конечного критерия оценки), тамоксифеном (1 мг/субъекта, п.к./о.р.д.д. (один раз в два дня) до конечного критерия оценки), фулвестрантом (Фаслодекс[®]; 1 мг/субъекта или 3 мг/субъекта при необходимости, п.к./еженедельно. Х 5 и увеличивали при необходимости) или RAD1901 (30, 60 или 120 мг/кг субъекта, п.о./о.р.д. до конечного критерия оценки), как указано, с дня 0. Период лечения длился в течение 56-60 дней в зависимости от моделей. В питьевую воду для данных PDx моделей добавляли 17β -эстрадиол. Эффективность средства

[00148] Для всех исследований, начиная с дня 0, размеры опухоли измеряли цифровым штангенциркулем, и данные, включая отдельные и средние расчетные объемы опухолей (средний ОО (объем опухоли) \pm СОС, стандартная ошибка среднего), записывали для каждой группы; объем опухоли рассчитывали с применением формулы из публикации (Yasui et al. Invasion Metastasis 17:259-269 (1997)), которая включена в настоящую заявку посредством ссылки): $\text{ОО} = \text{ширина}^2 \times \text{длина} \times 0,52$. Анализ каждой группы или исследование прекращали, когда расчетный средний объем опухоли группы достигал конечной точки объема опухоли (ОО) (конечная точка времени составляла 60 дней; и конечная точка объема составляла среднее значение для группы, составляющее 2 cm^3); отдельных мышей, объем опухоли которых достигал 2 cm^3 или более, исключали из исследования, а итоговое измерение включали в среднее значение для группы до тех пор, пока среднее значение не достигало конечной точки объема, или исследование не достигало конечной точки времени.

Расчеты эффективности и статистический анализ

[00149] Значения % ингибирования роста опухоли (%ИРО) рассчитывали в одной временной точке (когда контрольная группа достигала конечной точки объема опухоли или конечной точки времени) и приводили для каждой группы лечения (T) по сравнению с контролем (C) с применением исходных (i) и конечных (f) измерений опухоли по формуле (In vivo methods for screening and preclinical testing. In: Teicher B, ed., Anticancer Drug Development Guide. Totowa, NJ: Humana. 2004:99-123): $\% \text{ИРО} = 1 - \frac{T_f - T_i}{C_f - C_i}$.

Статистический анализ

[00150] Исследования ИРО - однофакторный дисперсионный анализ ANOVA +

критерий множественного сравнения Даннета (Corbett TH et al).

Отбор образца

[00151] Опухоли отбирали в конечной точке. Один фрагмент быстро замораживали, тогда как другой фрагмент помещали в 10% ФЗН (формалин забуференный 5 нейтральный) по меньшей мере на 24 часа и фиксировали формалином и заливали парафином (ФФЗП). Быстро замороженные образцы хранили при температуре -80°C; блоки ФФЗП хранили при комнатной температуре.

Вестернблоттинг

[00152] Клетки собирали, и экспрессию белка анализировали с применением

10 стандартной методики. Опухоли собирали в указанные временные точки после последнего дня введения дозы, гомогенизировали в буфере RIPA с ингибиторами протеазы и фосфатазы с применением гомогенизатора TissueLyser (Qiagen). Равные объемы белка разделяли в зависимости от молекулярной массы, переносили на нитроцеллюлозные мембранны и получали отпечаток промоканием со следующими 15 антителами с применением стандартной методики:

Рецептор эстрогенов (Santa Cruz (HC-20); sc-543)

Рецептор прогестеронов (Cell Signaling Technologies; 3153)

Винкулин (Sigma-Aldrich, v9131)

[00153] Анализы методом кПЦР (количественной полимеразной цепной реакции)

20 проводили следующим образом: клетки собирали, экстрагировали мРНК, и равные объемы использовали для синтеза кДНК и кПЦР с праймерами, специальными для рецептора прогестеронов, GREB1 и TFF1 (LifeTech). Полосы количественно определяли с применением программного обеспечения ID Quant (GE).

Иммуноистохимия

25 [00154] Опухоли собирали, фиксировали формалином, заливали парафином. Залитые опухоли разрезали (6 мкМ) и окрашивали антителами, специальными в отношении ER, PR и Her2. Количественное определение проводили следующим образом: пять полей подсчитывали в отношении положительных клеток (0-100%) и интенсивности окрашивания (0-3+). Показатели по Н-шкале (0-300) рассчитывали с применением 30 следующей формулы: % положительности * интенсивность.

[00155] Пример I. Комбинации КАБ1901-эверолимус обеспечивали усиленное ингибирование роста опухоли в опухоли и/или раке, которые экспрессировали ER ДТ или мутантный ER (например, Y537S), при различной предшествующей эндокринной терапии.

35 [00156] 1(A). Эффективность RAD1901 на ксенотрансплантатных моделях на животных

[00157] I(A)(i) RAD1901 ингибировал рост опухоли на PDx моделях (от PDx-1 до PDx-12) вне зависимости от ER статуса и предшествующей эндокринной терапии

40 [00158] Фиг. 1 демонстрирует эффекты ингибирования роста опухоли на различных PDx моделях для мышей, получавших лечение RAD1901 в монотерапии. Проводили скрининг двенадцати полученных от пациентов ксенотрансплантатных моделей для исследования ответа на RAD1901 при множестве генетических фонов с варьирующими уровнями ER, PR и Her2. Полное исследование эффективности проводили для PDx моделей, помеченных «*» (от PDx-1 до PDx-4 и PDx-12), с n=8-10. Скрининговое 45 исследование проводили для других PDx моделей (от PDx-5 до PDx-11), с n=3. PDx модели получали лечение наполнителем (отрицательный контроль) или RAD1901 в дозе 60 мг/кг в течение 60 дней п.о., о.р.д.. Как продемонстрировано на фиг. 1, PDx модели, в которых рост запускался ER и дополнительным движущим механизмом (например,

PR+ и/или Her2+), получали пользу от вариантов лечения RAD1901. RAD1901 являлся эффективным при ингибировании роста опухоли на моделях с мутациями ER и/или с высоким уровнем экспрессии Her2 (PDx) вне зависимости от предшествующего лечения: для не получавших лечения (не получавшие рецептурных ЛП, лекарственных

5 препаратов) или получавших лечение ингибитором ароматазы, тамоксиленом (там), химиотерапией (химио), ингибиторами Her2 (Her2 и, например, трастузумабом, лапатинибом), бевацизумабом, фулвастрантом и/или ритуксимабом.

[00159] I(A)(ii) Комбинация RAD1901-эверолимус запускает большую регрессию, чем RAD1901 в монотерапии, на ксенотрансплантатных моделях, экспрессирующих
10 ER ДТ

[00160] I(A)(ii)(1) RAD1901-эверолимус запускает большую регрессию, чем RAD1901 в монотерапии, на ксенотрансплантатах MCF-7, которые являлись восприимчивыми к вариантам лечения фулвастрантом. Ксенотрансплантатная модель MCF-7

[00161] За два дня до имплантации клеток мышам Balb/C-Nude инокулировали гранулы 17 β -эстрадиола 0,18/высвобождение в течение 90 дней. Собирали клетки MCF-7 (PR+, Her2-), и 1×10^7 клеток имплантировали подкожно в правый бок мышей Balb/C-Nude. Когда средний размер опухоли достигал 200 мм^3 , мышей рандомизировали на группы лечения в зависимости от объема опухоли, и проводили лечение исследуемыми соединениями. Каждая группа получала лечение наполнителем (контроль, п.о., о.р.д., до конечного критерия оценки), фулвастрантом (Фаслодекс®; 3 мг/субъекта, п.к., о.р.н., X 5 и продолжали в случае необходимости), RAD1901 (30 мг/кг или 60 мг/кг субъекта, п.о., о.р.д., до конечного критерия оценки), эверолимусом (2,5 мг/кг п.о., до конечного критерия оценки) или комбинацией RAD1901-эверолимус в дозах, как указано с дня 0.
25 Период лечения длился в течение 28 дней.

[00162] Проводили лечение ксенотрансплантатных мышей MCF-7 наполнителем (отрицательный контроль), RAD1901 (60 мг/кг, п.о., ежедневно), эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о.), комбинацией RAD1901 (30 или 60 мг/кг, п.о., ежедневно) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о.), фулвастрантом (3 мг/дозу, п.к., еженедельно) или комбинацией фулвастранта (3 мг/дозу, п.к., еженедельно) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о.). Размер опухоли измеряли в различные временные точки в течение 27 дней.

[00163] Результаты представлены на фиг. 2A-2B. Лечение комбинацией RAD1901 (60 мг/кг) и эверолимуса (2,5 мг/кг) вновь привело к значительной регрессии опухоли, с результатами, превосходящими лечение RAD1901, эверолимусом или фулвастрантом в монотерапии, или комбинацией фулвастранта и эверолимуса (фиг. 2B).
35

[00164] Фиг. 2C демонстрирует, что комбинации RAD1901-эверолимус с RAD1901 в дозе 30 мг/кг или 60 мг/кг обеспечивали аналогичные эффекты, несмотря на то, что RAD1901 в монотерапии в дозе 30 мг/кг являлся не настолько эффективным, как RAD1901 в монотерапии в дозе 60 мг/кг, в отношении ингибирования роста опухоли.
40 Указанные результаты свидетельствуют о том, что комбинации RAD1901-эверолимус с меньшей дозой RAD1901 (например, 30 мг/кг) было достаточно для увеличения до максимума эффектов в отношении ингибирования роста опухоли/регрессии опухоли на указанных ксенотрансплантатных моделях.

[00165] Лечение комбинацией RAD1901 и эверолимуса также являлось более эффективным в отношении уменьшения экспрессии ER и PR *in vivo* на ксенотрансплантатных моделях MCF-7, чем лечение RAD1901, эверолимусом или фулвастрантом в монотерапии или лечение комбинацией фулвастранта и эверолимуса (фиг. 11); опухоли собирали через два часа после последнего введения дозы).

[00166] I(A)(ii)(2) RAD1901-эверолимус запускали большую регрессию, чем RAD1901 в монотерапии, на PDx-11 и PDx-2 моделях, которые являлись восприимчивыми к вариантам лечения фулвестрантом.

[00167] PDx модели с ER ДТ PDx-2 (PR+, Her2+, не получавшие лечения) и PDx-11

⁵ (PR+, Her2+, получавшие лечение ИА, фулвестрантом и химио) продемонстрировали различные чувствительности к фулвестранту (3 мг/дозу, о.р.н., п.к.). PDx-2 и PDx-11 модели получали лечение комбинацией RAD1901 (60 мг/кг, о.р.д., п.о.) и эверолимуса (2,5 мг/кг, п.о.), RAD1901 в монотерапии (60 мг/кг, о.р.д., п.о.), эверолимусом в монотерапии (2,5 мг/кг, п.о.) или фулвестрантом в монотерапии (3 мг/дозу, о.р.н., п.к.).

¹⁰ [00168] На PDx-11 моделях введение фулвестранта или эверолимуса в монотерапии в значительной степени ингибировало рост опухоли, причем у мышей, получавших лечение фулвестрантом, наблюдались лучшие эффекты в отношении ингибирования роста опухоли. Лечение фулвестрантом продемонстрировало незначительную регрессию опухоли (фиг. 3В). Неожиданно было установлено, что введение RAD1901 в монотерапии ¹⁵ или в комбинации с эверолимусом привело к значительной регрессии опухоли, причем комбинация обеспечила еще более значительные эффекты в отношении регрессии опухоли на PDx моделях с ESR1 дикого типа (фиг. 3В)).

[00169] На PDx-2 моделях пероральное введение RAD1901 в монотерапии обеспечило лучшие эффекты ингибирования роста опухоли по сравнению с инъекцией фулвестранта ²⁰ в монотерапии (фиг. 4А). Более того, введение RAD1901 или эверолимуса в монотерапии в значительной степени ингибировало рост опухоли. Неожиданно было установлено, что введение RAD1901 в комбинации с эверолимусом привело к еще более усиленному эффекту в отношении ингибирования роста опухоли (фиг. 4В)).

²⁵ [00170] Более того, на PDx-4 модели, которая являлась восприимчивой к лечению фулвестрантом (1 мг/дозу, п.к., о.р.н.), RAD1901-опосредованное ингибирование роста опухоли поддерживалось при отсутствии лечения по меньшей мере в течение двух месяцев после окончания периода лечения RAD1901 (30 мг/кг, п.о., о.р.д.), в то время как лечение эстрadiолом продолжали (фиг. 5).

³⁰ [00171] Таким образом, комбинация одного или нескольких вторых терапевтических средств с RAD1901, вероятно, приносит пользу пациенту при ингибировании роста опухоли после окончания лечения, в особенности, когда одно или несколько вторых терапевтических средств (например, эверолимус) необходимо снижать или отсрочивать в связи с нежелательными реакциями <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm488028.htm>.

³⁵ [00172] I(A)(iii)(1) RAD1901-эверолимус запускает большую регрессию, чем RAD1901 в монотерапии, на ксенотрансплантатных моделях, экспрессирующих мутантный ER (ER α Y537S)

[00173] I(A)(iii)(1) RAD1901-эверолимус запускает большую регрессию, чем RAD1901 в монотерапии, на моделях PDx-5, которые являлись слабо восприимчивыми к вариантам ⁴⁰ лечения фулвестрантом.

[00174] PDx-5 модели получали согласно аналогичному протоколу, как описано выше для PDx моделей. Размеры опухоли каждой группы введения доз измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля с нониусом, и объемы рассчитывали с применением формулы $(L^*W^2)^{*}0,52$.

⁴⁵ [00175] Ингибирование роста опухоли RAD1901 (60 мг/кг, о.р.д., п.о.), эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о.) и RAD1901 (60 мг/кг, о.р.д., п.о.) в комбинации с эверолимусом (2,5 мг/кг, п.о.) на PDx-5 моделях (PDx модели с полученной от пациента опухолью рака молочной железы, содержащей мутацию рецептора эстрогенов Y537S, PR+, Her2+,

предшествующее лечение ингибитором ароматазы) оценивали с применением способа, описанного в настоящей заявке. В случае опухолей, экспрессирующих определенные мутации ER α (например, Y537S), комбинированное лечение RAD1901 и эверолимусом являлось более эффективным в отношении ингибирования роста опухоли, чем лечение

каждым средством в монотерапии (фиг. 6В)). Данные PDx модели являлись слабо восприимчивыми к фулвестранту (3 мг/дозу). Комбинированное лечение RAD1901 и эверолимусом являлось более эффективным, чем лечение каждым средством в монотерапии, в отношении ингибирования роста опухоли на PDx-5 моделях (фиг. 6В).

[00176] Таким образом, результаты продемонстрировали, что RAD1901 являлся

эффективной эндокринной основой, которая потенцировала ингибирование роста опухоли средствами направленного действия. Более того, RAD1901 продемонстрировал мощную противоопухолевую активность на PDx моделях, полученных от пациентов, которые проходили множество предшествующих вариантов эндокринной терапии, включая таковых, которые являлись нечувствительными к фулвестранту.

[00177] I(A)(iv) Оценка фармакокинетики вариантов лечения фулвестрантом в отношении мышей, не несущих опухоль.

[00178] Мышам вводили различные дозы фулвестранта; наблюдалась значительная экспозиция дозы в отношении субъектов (фиг. 7).

[00179] Фулвестрант вводили бестимусным мышам в количестве 1,3 или 5 мг/дозу подкожно в день 1 (Д1 рецептурных ЛП) и день 8 (Д8 рецептурных ЛП, n=4/уровень дозы). Кровь собирали в указанные временные точки в течение 168 часов после введения второй дозы, центрифугировали, и плазму анализировали методом жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии.

[00180] 1(B) RAD1901 стимулировал выживаемость на ксенотрансплантатной модели метастазов головного мозга на мышах (внутричерепные модели MCF-7).

[00181] Затем потенциальную способность RAD1901 пересекать гематоэнцефалический барьер и ингибировать рост опухоли оценивали с применением ксенотрансплантатной модели внутричерепной опухоли MCF-7.

[00182] Самок бестимусных голых мышей (Crl:NU(NCr)-Foxn1nu) использовали для исследований ксенотрансплантатов опухоли. За три дня до имплантации опухолевых клеток всем исследованным животным подкожно между лопатками имплантировали гранулы эстрогена (0,36 мг E2, высвобождение в течение 60 дней, Innovative Research of America, Сарасота, Флорида) с применением стерилизованного троакара. Клетки adenокарциномы молочной железы человека MCF-7 культивировали до середины фазы логарифмического роста в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячьью сыворотку, 100 единиц/мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата, 2 mM глутамина, 10 mM HEPES, 0,075% бикарбоната натрия и 25 г/мл гентамицина. В день имплантации опухолевых клеток клетки трипсинизировали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в фосфатно-буферном солевом растворе при концентрации 5×10^7 клеток/мл. Каждая исследуемая мышь получала 1×10^6 клеток MCF-7, которые имплантировали внутричерепным способом.

[00183] Через пять дней после имплантации опухолевых клеток (обозначен как день 1 исследования) мышей рандомизировали на три группы по 12 животных в каждой, и проводили лечение наполнителем, фулвестрантом (0,5 мг/животное, ежедневно) или RAD1901 (120 мг/кг, ежедневно), как описано выше.

[00184] Конечная точка была определена как смертность или 3Х выживаемость контрольной группы в зависимости от того, какое событие наступит первым.

Переносимость лечения оценивали посредством измерений массы тела и частых

наблюдений клинических признаков нежелательных эффектов, вызванных лечением. Животным со снижением массы тела, превосходящим 30% для одного измерения, или превосходящим 25% для трех измерений, из соображений гуманности проводили эвтаназию, и данное событие классифицировали как смерть, связанную с лечением.

- 5 Приемлемую токсичность определяли как среднее снижение массы тела в группе, составляющее менее 20% в течение исследования, и не более одной смерти, связанной с лечением, на десять животных, получивших лечение, или 10%. В конце исследования животным проводили эвтаназию посредством итоговой пункции сердца с анестезией изофлураном. Концентрацию RAD1901 и фулвестранта в плазме и опухоли определяли 10 с применением ЖХ-МС/МС (жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии).

[00185] Анализ выживаемости Каплан-Майер продемонстрировал, что RAD1901 значительно увеличивал выживаемость по сравнению с фулвестрантом ($P<0,0001$; фиг. 8). Ни одно из животных в контрольной группе или группе фулвестранта не выжило к дню 20 и дню 34, соответственно, тогда как 41% (5/12) животных, получавших лечение 15 RAD1901, выжили до конца исследования в день 54.

[00186] Концентрация RAD1901 в плазме составила 738 ± 471 нг/мл, а во внутричерепной опухоли составила 462 ± 105 нг/г, что подтверждает гипотезу, согласно которой RAD1901 способен эффективно пересекать гематоэнцефалический барьер. Напротив, концентрации фулвестранта являлись по существу более низкими в плазме 20 (21 \pm 10 нг/мл) и во внутричерепной опухоли (8,3 \pm 0,8 нг/г).

[00187] I(C). Исследование 1 фазы лечения RAD1901 ER+ запущенного рака молочной железы.

[00188] В исследовании 1 фазы оценивали безопасность, переносимость и фармакокинетику на 44 здоровых женщинах в постменопаузальном периоде. 25 Дозолимитирующая токсичность не наблюдалась, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Экспозиция в плазме увеличивалась более чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

Субъекты

[00189] 8 женщин в постменопаузальном периоде с запущенной аденокарциномой 30 молочной железы (ER+ опухоль с не менее 1% окрашиванием ИГХ, HER2-отрицательная опухоль с общим состоянием по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, восточная объединенная группа онкологов) 0 или 1) включали в качестве субъектов в данное исследование 1 фазы. Субъекты должны были получать следующие предшествующие варианты лечения:

35 не более 2 предшествующих режимов химиотерапии в условиях запущенного/ метастазирующего заболевания

6 месяцев предшествующей эндокринной терапии и прогрессирование, наблюдавшееся при предшествующей эндокринной терапии

Исключали субъектов с нелеченными или симптоматическими метастазами в ЦНС 40 (центральной нервной системе) или с предшествующим противораковым лечением в пределах следующих окон:

Тамоксифен < 14 дней до первой дозы исследуемого лечения

Фулвестрант < 90 дней до первой дозы исследуемого лечения

Химиотерапия < 28 дней до первой дозы исследуемого лечения

45 Аналог РФЛГ (релизинг-фактора лутенизирующего гормона) < 12 месяцев до первой дозы исследуемого лечения

Критерии ДЛТ

Любая степень негематологической токсичности не менее 3 (исключая алопецию и

тошноту, рвоту или диарею, которые не подвергали лечению оптимальным лекарственным препаратом)

Любая степень гематологической токсичности не менее 3

Любая степень токсичности, которая приводит к прекращению приема

5 лекарственного препарата в течение > 7 дней

Период наблюдения дозолимитирующей токсичности представляет собой дни 1-28 цикла 1

Нежелательные явления, возникшие после начала лечения (НЯПНЛ)

[00190] НЯПНЛ регистрировали в течение всего исследования. Предварительные

10 данные обобщены в таблице 12. «n» представляет собой количество субъектов с по меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории, НЯ классифицировали согласно общей терминологии критериев нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) v4.0, и любого пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали

15 только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. Смертей или дозолимитирующих токсичностей не наблюдалось, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Большинство НЯ относились к степени 1 или 2. Наиболее распространенными связанными с лечением НЯ являлись диспепсия (5/8 пациентов) и тошнота (3/8 пациентов). Наблюдались два серьезных НЯ (СНЯ), первое -констипация

20 3 степени, связанная с лечением, второе - затруднение дыхания (эксудат в плевральной полости), не связанное с лечением.

[00191] Тяжело лечившиеся ранее субъекты данного исследования 1 фазы включали субъектов, ранее получавших лечение несколькими эндокринными средствами и средствами направленного действия, например, ингибиторами CDK4/6, PI3K и mTOR.

25 После лечения RAD1901 в ежедневной дозе 200 мг, вводимой пероральным способом, до 6 месяцев и в ежедневной дозе 400 мг, вводимой пероральным способом, в течение до двух месяцев дозолимитирующих токсичностей не наблюдалось. Таким образом, RAD1901 продемонстрировал потенциал лечения ER+ запущенного рака молочной железы, в особенности у субъектов, ранее получавших лечение эндокринными

30 средствами и/или средствами направленного действия, такими как ингибиторы CDK4/6, PI3K и mTOR.

[00192] Пример II. RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухоли и может быть доставлен в головной мозг.

[00193] На ксенотрансплантатах MCF-7, описанных в примере I(A)(i), также оценивали концентрацию RAD1901 в плазме и опухоли с применением ЖХ-МС/МС. В конце исследования концентрация RAD1901 в плазме составляла 344 ± 117 нг/мл, а в опухоли - 11118 ± 3801 нг/мл для уровня дозы 60 мг/кг. Аналогичное соотношение концентрации в опухоли к концентрации в плазме также наблюдалось для меньших уровней доз, когда концентрации в опухоли являлись приблизительно в 20-30 раз более высокими, чем в плазме. Уровни RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге для мышей, получавших лечение в течение 40 дней, обобщены в таблице 1. Значительное количество RAD1901 доставлялось в головной мозг получавших лечение мышей (например, см. соотношение ГМ/П (концентрация RAD1901 в головном мозге/концентрация RAD1901 в плазме)); это свидетельствует, что RAD1901 был способен пересекать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Неожиданно было установлено, что RAD1901, предпочтительно, накапливается в опухоли. См., например, соотношение О/П (концентрация RAD1901 в опухоли/ концентрация RAD1901 в плазме), представленное в таблице 1.

[00194] Пример III. RAD1901 ингибиравал путь передачи сигналов посредством ER

и вызывал деградацию ER.

[00195] III(A). RAD1901 уменьшал занятость ER в матке и гипофизе у здоровых субъектов-людей женского пола в постменопаузальном периоде.

[00196] Субъекты характеризовались продолжительностью аменореи по меньшей

мере 12 месяцев и уровнем ФСГ (фолликулостимулирующего гормона) в сыворотке, который соответствовал менопаузе. Возраст субъектов составлял 40-75 лет с ИМТ

(индексом массы тела) 18,0-30 кг/м². Матка субъектов являлась целостной. Исключали субъектов, у которых наблюдались доказательства клинически значимой патологии, увеличенный риск инсульта или венозное тромбоэмбическое событие в анамнезе, или которые использовали сопутствующие лекарственные препараты менее чем за 14 дней до поступления в клинический исследовательский центр (прием парацетамола был разрешен в течение до 3 дней до поступления).

[00197] ФЭС-ПЭТ проводили на исходном уровне и после 6 дней воздействия RAD1901 для оценки занятости ER в матке. RAD1901 оккупировал 83% и 92% ER в матке при уровнях дозы 200 мг (7 субъектов) и 500 мг (6 субъектов), соответственно.

[00198] Визуализация ФЭС-ПЭТ продемонстрировала значительное уменьшение связывания меченного эстрadiола как с маткой, так и с гипофизом после лечения RAD1901 200 мг или 500 мг (один раз/день, п.о., 6 дней).

[00199] В связи с высокой экспрессией ER в матке наблюдался мощный сигнал ФЭС-ПЭТ на исходном уровне до лечения RAD1901 (фиг. 9А, поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки субъекта 3, получавшего лечение уровнем дозы 200 мг, на исходном уровне; фиг. 9В, сагиттальный вид и поперечный вид скана ФЭС-ПЭТ матки, соответственно, субъекта 7, получавшего лечение уровнем дозы 500 мг, на исходном уровне). Однако при сканировании через четыре часа после введения дозы в день 6 исследования матка была слабо заметна (на уровне фонового сигнала или близко к фоновому сигналу ФЭС-ПЭТ (фиг. 9А), поперечный вид скана матки субъекта 3 в день 6; и фиг. 9В, сагиттальный вид и поперечный вид скана матки, соответственно, субъекта 7 в день 6). Эти данные согласовывались с деградацией ER и/или конкуренцией за связывание с рецептором. Фиг. 9А и 9В также включают скан КТ матки, которой был получен в результате сканирования ФЭС-ПЭТ и который демонстрирует присутствие матки до и после лечения RAD1901.

[00200] Затем количественно определяли результаты сканирования ФЭС-ПЭТ матки, чтобы продемонстрировать изменение связывания ER после введения доз по сравнению с исходным уровнем для 7 субъектов (фиг. 9С). Представлены данные субъектов 1-3 и субъектов 4-7 в качестве примеров группы дозы 200 мг и группы дозы 500 мг, соответственно. RAD1901 продемонстрировал устойчивую занятость ER при более низких уровнях дозы (200 мг).

[00201] На фиг. 10А-В продемонстрировано иллюстративное изображение скана ФЭС-ПЭТ матки (А) и гипофиза (В) перед (На исходном уровне) и после (После лечения) 40 лечения RAD1901 в дозе 500 мг п.о., один раз в день через шесть дней. На фиг. 10А продемонстрирован скан ФЭС-ПЭТ матки при (а) боковом поперечном сечении; (б) продольном поперечном сечении; и (с) продольном поперечном сечении.

[00202] На скане ФЭС-ПЭТ матки и гипофиза субъекта после введения доз наблюдалось отсутствие заметного сигнала связывания ER в матке (фиг. 10А, После 45 лечения) и гипофизе (фиг. 10В, После лечения), соответственно.

[00203] Таким образом, результаты продемонстрировали, что RAD1901 эффективно вызывал деградацию/деактивацию ER у человека в дозе 200 и 500 мг п.о., один раз/день через шесть дней.

[00204] Стандартный уровень накопления (СУН) для матки, мышц и костей рассчитывали и обобщали для вариантов лечения RAD1901 в дозе 200 мг и 500 мг п.о. ежедневно в таблицах 2 и 3, соответственно. После введения доз сигналы в матке были близки уровням от «тканей, отличных от тканей-мишеней», что свидетельствует о 5 полном затухании накопления ФЭС-ПЭТ после лечения RAD1901. В тканях, которые в значительной степени не экспрессируют рецептор эстрогенов, практически не наблюдалось изменений на сканах ПЭТ до лечения по сравнению со сканами после 10 лечения.

[00205] Таким образом, RAD1901 или соль или сольват (например, гидрат) указанного

10 соединения можно использовать при лечении раковых и/или опухолевых клеток характеризующихся сверхэкспрессией ER (например, рака молочной железы, рака матки и рака яичников), без оказания отрицательных эффектов на другие органы (например, кости, мышцы). RAD1901 или соль или сольват (например, гидрат) указанного 15 соединения может быть в особенности пригодным при лечении метастазирующих вариантов рака и/или опухолей, которые характеризуются сверхэкспрессией ER, в других органах, например, исходного рака молочной железы, рака матки и/или рака яичников, который мигрировал в другие органы (например, кости, мышцы), для лечения 20 поражений рака молочной железы, рака матки и/или рака яичников в других органах (например, костях, мышцах) без оказания отрицательных эффектов на указанные органы.

[00206] III(B). RAD1901 уменьшал экспрессию ER и ингибировал путь передачи сигналов посредством ER.

[00207] III(B)(i)(1) Комбинация RAD1901-эверолимус являлась более эффективной в отношении уменьшения экспрессии ER и PR на ксенотрансплантатных моделях MCF-25 7, чем лечение RAD1901, эверолимусом или фулвестрантом в монотерапии или комбинацией фул-эверолимус.

[00208] Лечение комбинацией RAD1901 и эверолимуса являлось также более эффективным в отношении уменьшения экспрессии ER и PR *in vivo* на ксенотрансплантатных моделях MCF-7 (как описано в примере I(A)(ii)), чем лечение 30 RAD1901, эверолимусом или фулвестрантом в монотерапии или лечение комбинацией фулвестранта и эверолимуса (фиг. 11); опухоли собирали через два часа после последнего введения дозы).

[00209] III(B)(i)(2) Сравнение RAD1901 и фулвестранта на линиях клеток MCF-7 и T47D.

[00210] Эффекты RAD1901 и фулвестранта сравнивали с применением линий клеток MCF-7 и T47D, обе из которых представляют собой линии клеток рака молочной железы человека, при различных концентрациях, 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ (фиг. 12A для 35 анализов линии клеток MCF-7; и фиг. 12B для анализов линий клеток T47D). В качестве маркеров использовали три гена-мишени ER, рецептора прогестеронов (PgR), регуляции роста эстрогеном в раке молочной железы 1 (growth regulation by estrogen in breast cancer, GREB1) и фактора «трилистника» 1 (trefoil factor, TFF1). RAD1901 вызывал практически 40 полную деградацию ER и ингибировал передачу сигналов посредством ER (фиг. 12A-B). В особенности в случае линий клеток MCF-7 фулвестрант продемонстрировал сравнимую или даже незначительно более высокую эффективность в отношении 45 ингибирования передачи сигналов посредством ER при введении в одинаковой концентрации. Неожиданно было установлено, что RAD1901 являлся сравнимым или более эффективным, чем фулвестрант, при ингибировании роста опухоли и запускал регрессию опухоли, как раскрыто выше в примере I(A) и примере I(B).

[00211] III(B)(i)(3) Лечение RAD1901 привело к деградации ER и отмене передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатной модели MCF-7, описанной выше в примере I(A)(ii)(1).

[00212] Лечение RAD1901 привело к деградации ER *in vivo* (фиг. 13A и 13B, t-критерий

5 Стьюдента: **p*-значение <0,05, ***p*-значение <0,01) и ингибировало передачу сигналов посредством ER *in vivo* (фиг. 13A и 13C, t-критерий Стьюдента: **p*-значение <0,05, ***p*-значение <0,01).

[00213] В опухоли, которую отбирали от ксенотрансплантата MCF-7 через 2 часа после введения последней дозы RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг, п.о., о.р.д.) или фулвестранта 10 (3 мг/дозу, п.к., о.р.н.), наблюдалось значительное уменьшение экспрессии ER и PR (фиг. 13A-B). В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов после введения последней дозы лечения фулвестрантом, наблюдалась увеличенная экспрессия PR и ER. Однако в опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов после введения последней дозы лечения RAD1901, наблюдалась уменьшенная экспрессия PR 15 и ER (фиг. 13A и 13C).

[00214] В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 8 часов или через 12 часов после введения однократной дозы RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), наблюдалось быстрое уменьшение экспрессии PR (фиг. 14A-C). В опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 через 4 часа или через 24 часа после введения 7-ой дозы 20 RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), наблюдалось стойкое и стабильное ингибирование передачи сигналов посредством ER (фиг. 14B). Количественное определение анализов вестернблоттинга опухоли, взятой у ксенотрансплантата MCF-7 в различные временные точки в течение лечения RAD1901 (30 мг/кг, 60 мг/кг или 90 мг/кг, п.о., о.р.д.), продемонстрировало дозозависимое уменьшение PR (фиг. 14C).

25 [00215] Лечение RAD1901 вызвало быстрое уменьшение пролиферации на ксенотрансплантатных моделях MCF-7. Например, опухоль, взятую у ксенотрансплантатных моделей MCF-7 через 8 часов после введения однократной дозы RAD1901 (90 мг/кг, п.о., о.р.д.) и через 24 часа после введения 4-ой дозы RAD1901 (90 мг/кг, п.о., о.р.д.), разрезали на срезы и окрашивали, чтобы продемонстрировать быстрое 30 уменьшение уровня маркера пролиферации Ki67 (фиг. 15Ai 15B).

[00216] Данные результаты свидетельствуют, что лечение RAD1901 приводит к деградации ER и ингибированию передачи сигналов посредством ER на ксенотрансплантатах ER ДТ *in vivo*.

[00217] III(B)(i)(4) Лечение RAD1901 привело к деградации ER и к отмене передачи 35 сигналов посредством ER на PDx-4 моделях, описанных выше в примере I(A)(ii).

[00218] Лечение RAD1901 вызвало быстрое уменьшение пролиферации на PDx-4 моделях. Например, через четыре часа после введения последней дозы в последний день исследования эффективности в течение 56 дней в опухоли, взятой у PDx-4 моделей, получавших лечение RAD1901 (30, 60 или 120 мг/кг, п.о., о.р.д.) или фулвестрантом (1 40 мг/животное, о.р.н.), которые разрезали на срезы, наблюдалось быстрое уменьшение уровня маркера пролиферации Ki67 по сравнению с PDx-4 моделями, получавшими лечение фулвестрантом (фиг. 16).

[00219] Данные результаты свидетельствуют, что лечение RAD1901 приводит к деградации ER и ингибированию передачи сигналов посредством ER на 45 ксенотрансплантатах ER ДТ *in vivo*.

[00220] III(B)(ii) Лечение RAD1901 привело к уменьшению передачи сигналов посредством ER на PDx-5 моделях с мутантным ER, описанных выше в примере 1(A) (Ш)(1).

[00221] Опухоли собирали в указанные временные точки после последнего дня введения дозы (если не указано обратное), гомогенизировали в буфере RIPA с ингибиторами протеазы и фосфатазы с применением гомогенизатора TissueLyser (Qiagen). Равные объемы белка разделяли в зависимости от молекулярной массы, переносили на нитроцеллюлозные мембранны и получали отпечаток промоканием со следующим антителом, описанным в разделе «Материалы и методы»: receptor прогестеронов (PR, Cell Signaling Technologies; 3153).

[00222] Проводили количественное определение полос с применением программного обеспечения ID Quant (GE), и показатели ИГХ PR по шкале Оллреда, полученные на PDx-5 моделях, описанных в примере I(A)(iii)(1), показаны на фиг. 17. Фулвестрант оказывал незначительное влияние на экспрессию PR, тогда как RAD1901 продемонстрировал эффективность в дозах как 60 мг/кг, так и 120 мг/кг (о.р.д., п.о., фиг. 17).

[00223] Данные результаты свидетельствуют, что в случае опухолей, экспрессирующих определенные мутации ER α (например, Y537S), RAD1901 являлся более эффективным, чем фулвестрант, при ингибировании роста опухоли, в особенности эффективным при ингибировании роста опухолей, которые являлись слабо восприимчивыми к лечению фулвестрантом (например, в дозе 3 мг/дозу, о.р.н., п.к., фиг. 6А, PDx-5). Более того, в случае опухолей, которые не отвечали хорошо на лечение фулвестрантом (например, PDx-5), RAD1901 являлся эффективным для уменьшения экспрессии PR *in vivo*, в то время как фулвестрант не являлся эффективным (фиг. 17).

[00224] Пример IV. Влияние лечения RAD1901 на ткани матки и/или МПК

[00225] IV(A(1)): RAD1901 выступал в качестве антагониста стимуляции ткани матки эстрadiолом.

[00226] Утеротропные эффекты RAD1901 исследовали посредством оценки изменений массы матки, гистологии и экспрессии гена C3 у неполовозрелых крыс. Результаты репрезентативного исследования представлены на фиг. 18A-D. Оценка утеротропной активности

[00227] Детенышей крыс Спрег-Доули отлучали от матери на 19 день жизни, 30 рандомизировали в группы (n=4) и вводили наполнитель (водную метилцеллюлозу), E2 (0,01 мг/кг), ралоксилен (3 мг/кг), тамоксилен (1 мг/кг), RAD1901 в монотерапии (от 0,3 до 100 мг/кг) или RAD1901 (от 0,01 до 10 мг/кг) в комбинации с E2 (0,01 мг/кг), посредством подкожной инъекции или через желудочный зонд в установленном порядке (см. раздел «Реактивы», выше), один раз в день в течение 3 последовательных дней.

[00228] Через двадцать четыре часа после введения последней дозы всем животным проводили эвтаназию посредством ингаляции диоксида углерода. Для каждого животного регистрировали массу тела и чистую массу матки. Аналогичные анализы также проводили с RAD1901 (от 0,03 до 100 мг/кг) на крысах и мышах (Charles River Laboratories, Монреаль, Квебек).

[00229] Свежую ткань матки от каждой крысы фиксировали в 4% парформальдегиде, обезвоживали этанолом и заливали в пластичный полимер JB4. Получали срезы толщиной 8 мкм и окрашивали 0,1% толуидиновым синим О. Толщину эпителия эндометрия измеряли с помощью микроскопа Zeiss Axioskop 40 с применением программы Spot Advanced; рассчитывали среднее из 9 измерений на образец.

[00228] Экспрессия гена компонента 3 (C3) комплемента в матке

[00229] Для определения относительных уровней экспрессии C3 в получавшей лечение ткани матки экстрагировали РНК из оставшейся ткани с применением набора для очистки РНК Micro to Midi Total RNA Purification Kit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния)

согласно инструкциям производителя. РНК количественно определяли, и проводили обратную транскрипцию равных объемов с применением набора High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Фостер-Сити).

[00230] Количественную ПЦР проводили с применением системы ABI Prism 7300

⁵ (Applied Biosystems). ПЦР проводили с применением мастер-микс Taqman Universal с наборами зондов для C3 и для 18S рибосомальной РНК в качестве эталонного гена. Условия циклического температурного воздействия включали исходный этап денатурации при температуре 95°C в течение 10 мин., после чего следовали 40 циклов при температуре 95°C в течение 15 секунд и при температуре 60°C в течение 1 минуты.

¹⁰ [00231] Относительную экспрессию гена определяли посредством нормирования каждого образца к эндогенному контролю (18S) и сравнения с калибратором (наполнителем). Относительную экспрессию гена определяли с применением следующего уравнения: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (где Ct = пороговый цикл или номер цикла, на котором продукт ПЦР был впервые обнаружен, ΔCt = нормированное значение образца, и $\Delta\Delta Ct$ =
¹⁵ нормированная разность между субъектом, получавшим дозу, и наполнителем). Определения экспрессии гена в пяти повторах проводили для каждой дозы во время каждого исследования.

[00232] Лечение E2 (0,01 мг/кг), ралоксифеном (РАЛ, 3 мг/кг) или тамоксифеном (ТАМ, 1 мг/кг) привело к значительному увеличению чистой массы матки по сравнению ²⁰ с наполнителем в монотерапии, тогда как лечение RAD1901 в диапазоне доз от 0,3 до 100 мг/кг значительно не влияло на чистую массу матки (фиг. 18А). Представленные данные (фиг. 18А) представляют собой средние значения (\pm СОС); n=4 крыс на группу; Р по сравнению с наполнителем: * < 0,05; по сравнению с E2: \ddagger < 0,05. Также при введении в комбинации с E2 (0,01 мг/кг) RAD1901 выступал в качестве антагониста E2-
²⁵ опосредованной стимуляции матки дозозависимым способом, демонстрируя значительное ингибирование утеротропной активности в дозе 0,1 мг/кг и более и полное ингибирование в дозе 3 мг/кг. EC₅₀ для RAD1901 составляла приблизительно 0,3 мг/кг. Аналогичные результаты были получены на мышах, когда дозы RAD1901 от 0,03 до ³⁰ 100 мг/кг также не оказывали эффекта в отношении чистой массы матки или толщины эпителия (данные не показаны).

[00233] Затем связанные с лечением изменения ткани матки исследовали посредством количественной микроскопической гистологии. Наблюдалось статистически значимое ³⁵ увеличение толщины эндометриального эпителия после лечения E2 в дозах 0,01 и 0,3 мг/кг (фиг. 18В). Значительное увеличение толщины эпителия также наблюдалось после лечения тамоксифеном (1 мг/кг) или ралоксифеном (3 мг/кг). Напротив, лечение RAD1901 не вызвало увеличения толщины эндометриального эпителия до наивысшей исследованной дозы 100 мг/кг. Иллюстративные изображения эпителия эндометрия представлены на фиг. 18С.

[00234] В соответствии с изменениями массы матки и толщины эндометриального ⁴⁰ эпителия E2, тамоксиfen и ралоксифен значительно повышали экспрессию гена регулируемого эстрогеном комплемента, C3 (фиг. 18D). Напротив, RAD1901 не повышал экспрессию гена C3 ни в одной из исследованных доз (от 0,3 до 100 мг/кг). Более того, RAD1901 в дозах 1, 3 и 10 мг/кг значительно подавлял стимулированную E2 экспрессию гена C3.
⁴⁵

RAD1901 не стимулирует матку неполовозрелых самок крыс

[00235] Неполовозрелым самкам крыс вводили один раз в день в течение 3 последовательных дней наполнитель (НАПОЛН), эстрадиол (E2), Ралоксифен (РАЛ), Тамоксифен (ТАМ), RAD1901 или RAD1901+E2. Измеряли чистую массу матки.

Представленные данные (фиг. 18) представляют собой средние значения (\pm СОС); n=4 крыс на группу; Р по сравнению с наполнителем: * < 0,05; по сравнению с E2: ‡ < 0,05.

Пример II(A)(2). Лечение RAD1901 защищало от атрофии костной ткани у крыс после овариоэктомии

[00236] Специфичные в отношении костей эффекты RAD1901 исследовали на крысах после овариоэктомии.

[00237] Для получения модели постменопаузальной атрофии костной ткани проводили овариоэктомию на взрослых самках крыс Спрег-Доули при анестезии с симуляцией хирургического вмешательства в качестве контроля. После хирургического

вмешательства крысы после овариоэктомии получали лечение один раз в день в течение 4 недель наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (0,1, 0,3, 1, 3 мг/кг), которые вводили, как описано выше; группы включали по 20 животных. Животные в группе симуляции хирургического вмешательства получали лечение наполнителем. Всем животным проводили эвтаназию посредством ингаляции диоксида углерода через 24 часа после введения последней дозы. Минеральную плотность костей оценивали на исходном уровне и снова через 4 недели лечения с применением двухэмиссионной рентгеновской абсорбциометрии PIXImus.

[00238] При вскрытии левую бедренную кость каждого животного отбирали, рассекали без присутствия мягких тканей и хранили в 70% этаноле перед проведением анализа. Подробную качественную и количественную 3-Д оценку проводили с применением системы micro-CT40 (Scanco Systems, Уэйн, Пенсильвания). Для каждого образца получали 250 изображений срезов метафиза дистальной бедренной кости. Морфометрические параметры определяли с применением прямого 3-Д подхода в предварительно выбранных областях для анализа. Параметры, которые определяли в трабекулярной кости, включали плотность объема костей, плотность поверхности костей, число трабекул, толщину трабекул, расстояние между трабекулами, плотность соединительной ткани и кажущуюся плотность костей.

[00239] После овариоэктомии у не получавших лечение (получавших контроль -наполнитель) крыс наблюдалось уменьшение минеральной плотности костей как во всей полной бедренной кости, так и в поясничном отделе по сравнению с исходным уровнем (таблица 4). Лечение E2 было связано с предотвращением атрофии костной ткани как в бедренной кости, так и в спинном хребте. Лечение RAD1901 привело к дозозависимому и статистически значимому подавлению вызванной овариоэктомией атрофии костной ткани (данные представлены для группы лечения 3 мг/кг). В дозах от 0,1 мг/кг до 3 мг/кг минеральная плотность костей у получавших лечение RAD1901 крыс была полной при отсутствии статистически значимых различий по сравнению с группой, получавшей лечение E2.

[00240] Анализ дистальной бедренной кости методом микро-КТ (таблица 5) продемонстрировал, что овариоэктомия вызвала значительные изменения количества ключевых параметров микроархитектуры по сравнению с животными с симуляцией хирургической операции. Данные изменения согласовывались с уменьшением массы костей и включали уменьшение объема костей, уменьшение числа трабекул, толщины и плотности и увеличение разделения трабекул. В соответствии с сохранением минеральной плотности костей, которое наблюдалось после лечения RAD1901, в ключевых микроструктурных параметрах наблюдалось значительное сохранение архитектуры трабекул (таблица 5).

[00241] Пример IV(B): Исследование 1 фазы с увеличением дозы RAD101 у здоровых женщин в постменопаузальном периоде

[00242] В исследовании 1 фазы оценивали безопасность, переносимость и фармакокинетику на 44 здоровых женщинах в постменопаузальном периоде. Дозолимитирующие токсичности (ДЛТ) не наблюдались, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Экспозиция в плазме увеличивалась более чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

Субъекты

[00243] 44 здоровых женщин в постменопаузальном периоде включали в качестве субъектов в данное исследование 1 фазы. Субъекты характеризовались продолжительностью аменореи по меньшей мере 12 месяцев и уровнем ФСГ в сыворотке, который соответствовал менопаузе. Возраст субъектов составлял 40-75 лет с ИМТ 18,0-30 кг/м². Исключали субъектов, у которых наблюдались доказательства клинически значимой патологии, увеличенный риск инсульта или венозное тромбоэмболическое событие в анамнезе, или которые использовали сопутствующие лекарственные препараты менее чем за 14 дней до поступления в клинический исследовательский центр (прием парацетамола был разрешен в течение до 3 дней до поступления).

Введение доз

[00244] Субъекты получали лечение плацебо или по меньшей мере одну дозу, вводимую пероральным способом, ежедневно после легкого завтрака в течение 7 дней при уровнях дозы 200 мг, 500 мг, 750 мг и 1000 мг, соответственно. Ключевые демографические показатели на исходном уровне 44 здоровых женщин в постменопаузальном периоде, включенных в исследование 1 фазы, обобщены в таблице 6.

Нежелательные явления, возникшие после начала лечения (НЯПНЛ)

[00245] Регистрировали НЯПНЛ, и наиболее частые (>10% пациентов в суммарной активной группе, у которых наблюдались любые связанные НЯПНЛ) нежелательные явления (НЯ) обобщены в таблице 7, «п» представляет собой количество субъектов с по меньшей мере одним связанным с лечением НЯ в данной категории, НЯ классифицировали согласно общей терминологии критериев нежелательных явлений (CTCAE) v4.0, и любого пациента с несколькими сценариями одного и того же предпочтительного термина подсчитывали только один раз и относили к наиболее тяжелой степени. Дозолимитирующая токсичность не наблюдалась, максимально переносимая доза (МПД) не была установлена. Оценка фармакокинетики

[00246] Серии образцов крови отбирали в течение исследования для анализа RAD1901 в плазме. Образцы крови объемом по 5 мл каждый отбирали посредством баллонного внутривенного катетера или посредством прямой венопункции в пробирки, содержащие K₃-EDTA в качестве антикоагулянта. Устойчивого состояния достигали на день 5 лечения. Оценивали геометрическое среднее (Geo-Mean) профилей RAD1901 концентрация в плазме -время. Результаты определения фармакокинетики в плазме групп, получавших лечение RAD1901 (200, 500, 750 или 1000 мг), в день 7 (N=35) исследования представлены в таблице 8 и на фиг. 19 в качестве примера. Медиана t_{1/2} находилась в диапазоне между 37,5 и 42,3 часов (таблица 8). После введения нескольких доз RAD1901 медиана t_{max} варьировала в диапазоне между 3 и 4 часами после введения доз.

[00247] Пример V(A)-1. Моделирование связывания RAD1901-ERα с применением избранных опубликованных структур ER.

[00248] Если не указано обратное, когда структуры представлены реберной моделью, каждый конец связи окрашен тем же цветом, что и атом, к которому присоединена данная связь, где серый цвет представляет собой углерод, красный - кислород, синий -

азот и белый - водород.

[00249] Четырнадцать опубликованных структур (т.е. моделей) лиганд-связывающего домена (ЛСД) ER α , образовавших комплексы с различными лигандами ER, выбирали из 96 опубликованных моделей посредством тщательной оценки. Одна из данных

5 четырнадцати моделей представляла собой ZERT (ЛСД ER α человека, присоединенный к 4-гидрокситамоксифену (ОНТ)). ОНТ представляет собой активный метаболит тамоксифена и СМРЭ первого поколения, который действует в качестве антагониста в ткани молочной железы.

[00250] В ZERT (фиг. 20 и 21) сайт связывания ER α принимает вид трехслойного «сэндвича из спиралей», образующего гидрофобный карман, который содержит спираль 3 (H3), спираль 5 (H5) и спираль 11 (H11) (фиг. 20). Пунктирный ящик на фиг. 21 представляет собой сайт связывания и остатки в сайте связывания, которые являются важными или осуществляются в результате связывания ОНТ. ОНТ выступает в качестве антагониста посредством вытеснения H12 в сайт, в котором связывается коактиватор (или коактиваторы) LXXLL. ОНТ оккупирует пространство, в норме заполненное L540, и модифицирует конформацию четырех остатков на С-конце спирали 11 (G521, H524, L525 и M528). ОНТ также образует соляной мостик с D351, что приводит к нейтрализации заряда.

[00251] Другие тринадцать моделей ЛСД ER α -лиганд ER сравнивали с ZERT. Различия в положениях остатков данных моделей обобщены в таблице 10. Наложение структур ER α четырнадцати моделей (фиг. 22) демонстрирует, что данные структуры значительно отличаются в остатках E380, M421, G521, M522, H524, Y526, S527, M528, P535, Y537, L540 и различных комбинациях указанных остатков.

[00252] Расчеты среднего квадратичного отклонения (СКО) для любой пары четырнадцати моделей обобщены в таблице 11. Структуры считали перекрывающимися, когда СКО структур составляло <2 Å. Таблица 11 демонстрирует, что все четырнадцать моделей характеризуются СКО <1,5 Å. Применение анализа условного форматирования свидетельствует, что 1R5K и 3UUC являлись наименее подобными другим моделям (анализ не показан). Вследствие этого 1R5K и 3UUC считали уникальным, отдельным структурным кластером для исследования.

[00253] Остатки ER α , связанные лигандом на четырнадцати моделях, обобщены в таблице 12. В таблице 12 также представлена EC50 в комплексах ЛСД ER α - антагонист. Из четырнадцати моделей в тринадцати наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и E353; в двенадцати наблюдались пи-взаимодействия между лигандом и F404; в пяти наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и D351; в шести наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и H524; в четырех наблюдались взаимодействия водородной связи между лигандом и R394; и в одной (3UUC) наблюдались взаимодействия между лигандом и T347.

[00254] Каждую из четырнадцати моделей использовали для докинга случайной библиотеки из 1000 соединений плюс лиганд, с которым была опубликована модель (известный антагонист), для определения того, может ли модель обнаружить и отдавать предпочтение известному антагонисту. Если модель способна обнаружить известный антагонист, модель определяли как способную предсказывать положение ее собственного опубликованного лиганда. Затем рассчитывали EF₅₀ для количественного определения силы модели, чтобы увидеть, насколько данная модель превосходила случайный выбор. RAD1901 состыковывали в выбранных моделях (например, фиг. 23A и B - 27A и B). Определяли показатели докинга опубликованного лиганда и RAD1901

в моделях. Также определяли EC₅₀. Визуальное изучение RAD1901 продемонстрировало, что данное соединение «подчинялось» взаимодействию, представленному с опубликованными лигандами в 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ. Пространственные конфликты не были отмечены. Согласно определенным вариантам реализации 5 настоящего изобретения, например, в 1R5k и 2BJ4, RAD1901 обладал более высоким показателем докинга, чем опубликованный лиганд.

[00255] Результаты оценки девяти моделей (1ERR, 3ERT, 3UCC, 2IOK, 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ) обобщены в таблице 13.

[00256] 1ERR и 3ERT не могли предсказать верное положение своего 10 кристаллизованного лиганда. RAD1901 не состыковывался в 3UCC. Тетрагидронафтален связывался в 2IOK-RAD1901 нетрадиционным способом.

[00257] Основные различия между моделями 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ наблюдались в остатках в C-конце спирали 11 (G521-M528).

[00258] На фиг. 23А и В представлено моделирование RAD1901-1R5K (A) и GW5-15 1R5K (B). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353, R394 и L536; и посредством пи-взаимодействия с F404.

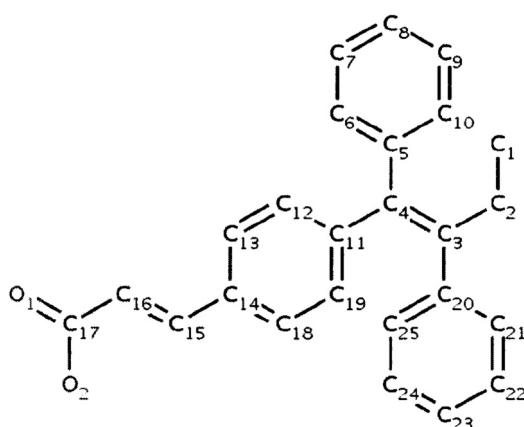
[00259] На фиг. 24А и В представлено моделирование RAD1901-1SJ0 (A) и E4D-1SJ0 (B). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353 и D351; и посредством пи-взаимодействия с F404.

[00260] На фиг. 25А и В представлено моделирование RAD1901-2JFA (A) и RAL-2JFA (B). RAD1901 связывался посредством пи-взаимодействия с F404.

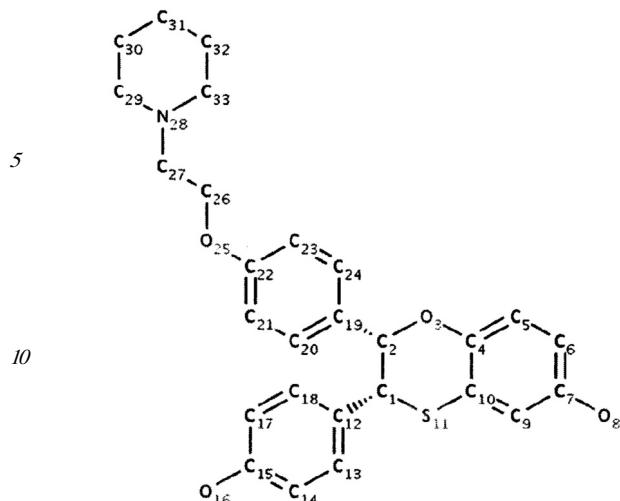
[00261] На фиг. 26А и В представлено моделирование RAD1901-2BJ4 (A) и OHT-2BJ4 (B). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353 и R394; и посредством пи-взаимодействия с F404.

[00262] На фиг. 27А и В представлено моделирование RAD1901-2IOK (A) и IOK-2IOK (B). RAD1901 связывался посредством взаимодействия водородной связи с E353, R394 и D351; и посредством пи-взаимодействия с F404.

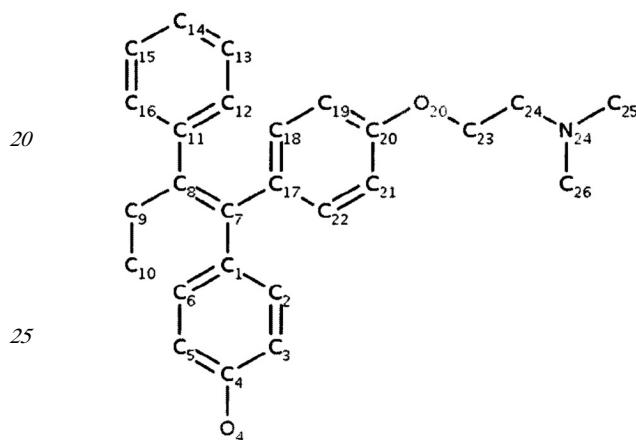
[00263] Опубликованные лиганды в моделях имеют следующие структуры:



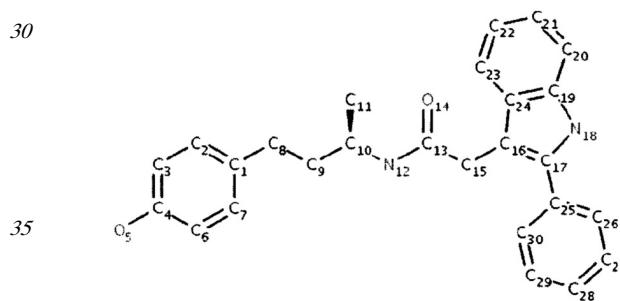
GW5, (2E)-3-{4-[(1E)-1,2-ДИФЕНИЛБУТ-1-ЕНИЛ]ФЕНИЛ}АКРИЛОВАЯ КИСЛОТА



15 E4D, (2S,3R)-2-(4-(ПИПЕРИДИН-1-ИЛ)ЭТОКСИ)ФЕНИЛ)-2,3-ДИГИДРО-3-(4-
ГИДРОКСИФЕНИЛ)БЕНЗО[В][1,4]ОКСАТИИН-6-ОЛ



ОНТ, 4-ГИДРОКСИТАМОКСИФЕН



40 ИОК, N-[(1R)-3-(4-ГИДРОКСИФЕНИЛ)-1-МЕТИЛПРОПИЛ]-2-(2-ФЕНИЛ-1Н-
ИНДОЛ-3-ИЛ)АЦЕТАМИД

[00264] Пример V(A)-2. Докинг индуцированного соответствия (ДИС) ER_a с RAD1901 и фулвестрантом

[00265] Конформацию связывания RAD1901 в ER_a дополнительно оптимизировали посредством анализа ДИС пяти кристаллических структур ER_a: 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ. В анализе ДИС учитывали гибкость рецептора (после связывания лиганда) для аккомодации его правильной конформаций связывания.

[00266] Библиотеку различных конформаций для каждого лиганда (например, RAD1901 и фулвестранта) получали посредством поиска локальных минимумов как функции вращений относительно вращающихся связей. Библиотека для RAD1901

содержала 25 различных конформаций.

[00267] Пять кристаллических структур ER_a получали и минимизировали. Соответствующий лиганд в опубликованных рентгеновских структурах использовали для определения кармана связывания ER_a.

[00268] Конформаций RAD1901 состыковывали в полученные структуры ER_a, где данным конформациям позволяли вызывать движения боковой цепи или остова к остаткам, расположенным в кармане связывания. Данные движения позволяли ER_a изменять сайт связывания, так что он приобретал более близкую конформацию к форме и способу связывания конформаций RAD1901. В некоторых примерах при анализе ДИС допускали небольшие релаксации остова в структуре рецептора и значительные изменения конформаций боковой цепи.

[00269] Эмпирическую оценочную функцию использовали для приближения свободной энергии связывания лиганда с целью получения показателя докинга, или Gscore. Gscore также известен как GlideScore, и в данном примере данный термин можно использовать взаимозаменяясь с показателем докинга. Показатель докинга представлял собой оценку аффинности связывания. Вследствие этого чем ниже значение показателя докинга, тем «лучше» лиганд присоединяется к своему рецептору. Показатель докинга от -13 до -14 соответствовал очень хорошему взаимодействию связывания.

[00270] Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа ДИС с 1R5K, 1SJ0, 2JFA, 2BJ4 и 2OUZ, соответственно, накладывали, чтобы продемонстрировать различия между ними (фиг. 28-30A и B, показаны на реберной модели). Все связи в каждой конформации RAD1901 на фиг. 28, 29 и 30A представлены одинаковым цветом.

[00271] Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 1R5K (синий) и 2OUZ (желтый), содержали группу RAD1901 N-бензил-N-этиланилин на передней стороне (фиг. 28). Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 2BJ4 (зеленый) и 2JFA (розовый), содержали группу RAD1901 N-бензил-N-этиланилин на задней стороне (фиг. 29). Конформаций RAD1901, полученные в результате анализа с 2BJ4 (зеленый), 2JFA (розовый) и 1SJ0 (коричневый), являлись вполне аналогичными, что демонстрируется наложениями данных конформаций (фиг. 30A и 30B). Показатели докинга ДИС RAD1901 обобщены в таблице 14.

[00272] ДИС RAD1901 с 2BJ4 продемонстрировал взаимодействия водородной связи с E353 и D351 и пи-взаимодействия с F404 (фиг. 31A-31C). На фиг. 31A представлены области в сайте связывания, подходящие для акцепторной группы водородной связи (красный), донорной группы водородной связи (синий) и гидрофобной группы (желтый). На фиг. 31A и 31B светло-синий цвет означает углерод для RAD1901. На фиг. 32A-32C представлены взаимодействия белок-поверхность ДИС RAD1901 с 2BJ4. Фиг. 32A и 32B представляют собой вид спереди, и фиг. 32C представляет собой вид сбоку. Молекулярная поверхность RAD1901 окрашена синим цветом на фиг. 32A и зеленым - на фиг. 32C. Фиг. 32B и 32C представляет собой электростатическое представление доступной для растворителя поверхности ER_a, где красный цвет представляет собой электроотрицательную, и синий представляет собой электроположительную поверхность.

[00273] Аналогичный анализ ДИС проводили для фулвестранта с 2BJ4, как описано выше. ДИС фулвестрант-2BJ4 привел к получению Gscore, который составлял -14,945, и продемонстрировал взаимодействия водородной связи с E353, Y526 и H524 и пи-взаимодействия с F404 (фиг. 33A-33C). На фиг. 33A представлены области в сайте связывания, подходящие для акцепторной группы водородной связи (красный), донорной группы водородной связи (синий) и гидрофобной группы (желтый). На фиг.

33A светло-синий цвет означает углерод для RAD1901.

[00274] На фиг. 34А и 34В представлены RAD1901 и фулвестрант, состыкованный в 2BJ4 посредством ДИС, оба из которых образовывали пи-взаимодействия с F404 и взаимодействия водородной связи с E353. Более того, RAD1901 содержал взаимодействие

5 водородной связи с D351 (синий цвет представляет молекулярную поверхность RAD1901, фиг. 34В, в то время как фулвестрант содержал взаимодействие водородной связи с Y526 и H524 (зеленый цвет представляет молекулярную поверхность фулвестранта, фиг. 34С). Наложения 2BJ4, состыкованного с RAD1901 и фулвестрантом, показаны на фиг. 35А и 35В. На фиг. 35А зеленый цвет представляет собой молекулярную

10 поверхность фулвестранта, и синий цвет представляет собой молекулярную поверхность RAD1901. На фиг. 35В коричневая структура представляет собой фулвестрант, и синяя структура представляет собой RAD1901.

[00275] Пример V(A)-3. Оценка моделирования избранных мутаций ER α .

[00276] Оценивали эффекты различных мутаций ER α в отношении С-конца лиганд-15 связывающего домена. Конкретные мутации ER α , оценку которых проводили, представляли собой мутант Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G; и S463P.

[00277] Y537 расположен в спирали 12. Данный остаток может регулировать связывание лиганда, гомодимеризацию и связывание ДНК, когда является фосфорилированным, и может позволить ER α избежать опосредованных 20 фосфорилированием контролей и обеспечить клетке потенциальное селективное опухолевое преимущество. Помимо этого, данный остаток может вызывать конформационные изменения, которые приводят к постоянной активации рецептора.

[00278] Мутация Y537S способствует транскрипционно активной закрытой конформаций кармана независимо от того, занят карман лигандом или нет. Закрытый, 25 но не занятый карман может обуславливать конститутивную активность ER α (Carlson et al. Biochemistry 36:14897-14905 (1997)). Ser537 устанавливает взаимодействие водородной связи с Asp351, которое приводит к изменению конформаций спирали петли 11-12 и к заглублению Leu536 в недоступное для растворителя положение. Данное событие может способствовать конститутивной активности мутантного белка Y537S. 30 Мутация поверхности Y537S не оказывает влияния на структуру кармана ЛСД.

[00279] Y537N распространен в ER α -отрицательном метастазирующем раке молочной железы. Мутация в данном сайте может позволить ER α избежать опосредованных фосфорилированием контролей и обеспечить клетке потенциальное селективное опухолевое преимущество. В частности, замена Y537N вызывает конформационные 35 изменения в ER α , которые могут имитировать связывание гормона, не нарушая способности рецептора димеризоваться, но предоставляя рецептору функцию конститутивной трансактивации (Zhang et al. Cancer Res 57:1244-1249 (1997)).

[00280] Y537C оказывает аналогичный эффект в отношении Y537N.

[00281] D538G может сдвигать весь энергетический ландшафт посредством 40 стабилизации как активной, так и неактивной конформаций, несмотря на то, что более предпочтительной является активная конформация. Данное событие может приводить к конститутивной активности данного мутанта при отсутствии гормонов, как наблюдалось на устойчивых к гормонам вариантах рака молочной железы (Huang et al., "A newfound cancer activating mutation reshapes the energy landscape of estrogen-binding 45 domain," J.Chem. Theory Comput. 10:2897-2900 (2014)).

[00282] Ни одна из данных мутаций, как ожидается, не оказывает влияния на лиганд-связывающий домен и специфично не препятствует связыванию RAD1901. Y537 и D538 могут вызывать конформационные изменения, которые приводят к конститутивной

активации рецептора вне зависимости от связывания лиганда.

[00283] Пример V(B). Анализ связывания конструкций ER α дикого типа и мутанта ЛСД с RAD1901 и другими соединениями *in vitro*

[00284] Анализ связывания конструкций ER α дикого типа (ДТ) и мутантного ЛСД с RAD1901 *in vitro* продемонстрировал, что RAD1901 присоединяется к мутантному ER α с аналогичной аффинностью, что и к ER α ДТ.

[00285] Конструкции ER α ДТ и мутантного ЛСД получали посредством экспрессии и очистки соответствующих остатков ЛСД 302-552 с N-концевым тиоредоксином и метками 6xHis, которые отщеплялись протеазой TEV.

[00286] Метод флуоресцентной поляризации (ФП) использовали для определения связывания исследуемых соединений (RAD1901, фулвестранта, базедоксифена, ралоксифена, тамоксифена и AZD9496) с ER α согласно инструкциям производителя (Polar Screen, Invitrogen) с 2 нМ фторомона, 100 нМ конструкции ER α ДТ или мутантного ЛСД. Каждую серию проводили в двух повторах, и анализировали одно исследуемое соединение для определения IC₅₀ для различных конструкций ER α (фиг. 36 для анализа связывания RAD1901).

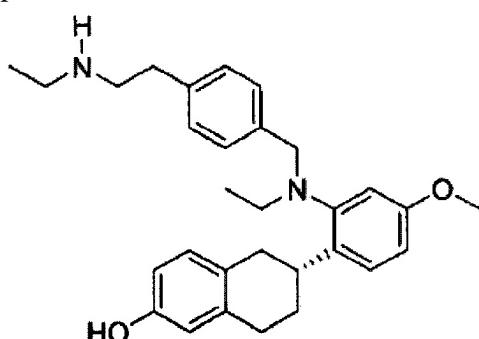
[00287] Как указано выше, вышеизложенное описание предназначено исключительно для иллюстрации различных вариантов реализации настоящего изобретения.

Специфические модификации, которые обсуждаются выше, не следует истолковывать как ограничения объема настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники очевидно, что можно получить различные эквиваленты, изменения и модификации без отклонения от объема настоящего изобретения, и следует понимать, что такие эквивалентные варианты реализации включены в настоящую заявку. Все источники, ссылки на которые содержатся в настоящей заявке, включены посредством ссылки в той же мере, как если бы указанные источники были полностью изложены в настоящей заявке.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения рака молочной железы у субъекта, страдающего от рака,

положительного по рецептору эстрогенов альфа, который имеет мутантный рецептор эстрогенов альфа, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества комбинации эверолимуса и RAD1901 следующей структуры:



или его соли или сольваты.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы является устойчивым к лекарственным препаратам раком молочной железы и является также устойчивым к одному или более вариантам антиэстрогеновой терапии и/или терапии ингибитором ароматазы.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанный один или более антиэстрогенов выбраны из группы, состоящей из тамоксифена, торемифена и фулвестранта, и

указанный один или более ингибиторов ароматазы выбраны из группы, состоящей из аромазина, летrozола и анастразола.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что у указанного субъекта экспрессируется по меньшей мере один мутантный рецептор эстрогенов альфа, выбранный из группы, состоящей из D538G, Y537S, Y537N, Y537C, E380Q, S463P, L536R, L536Q, P535H, V392I и V534E.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанный мутантный рецептор эстрогенов альфа выбран из группы, состоящей из Y537S, Y537N, Y537C, D538G, L536R, S463P и E380Q.

10 6. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанный мутантный рецептор альфа представляет собой Y537S.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный RAD1901 вводят в общей суточной дозе от 100 мг до 1000 мг.

15 8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанный RAD1901 вводят в общей суточной дозе 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг или 1000 мг.

9. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанная суточная доза доставляется в виде двух отдельных доз.

10 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанные отдельные дозы представляют собой одинаковые дозы.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой женщину в постменопаузальном периоде.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что для указанного субъекта впервые установлена необходимость лечения в результате анализа на предмет

25 повышенной экспрессии одного или более генов, выбранных из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEBPA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3,

30 FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL.

35 13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный один или более генов выбраны из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный эверолимус вводят в дозе от 1 мг до 500 мг в сутки.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанный эверолимус вводят в дозе от 40 5 мг до 100 мг в сутки.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный эверолимус вводят в суточной дозе 10 мг.

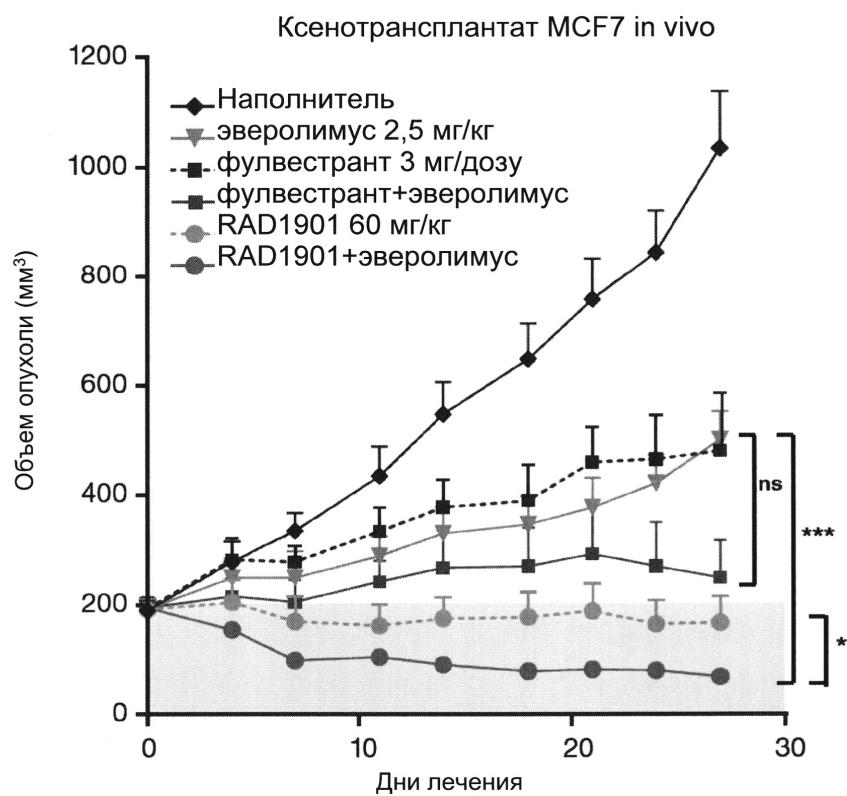
17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный эверолимус вводят в суточной дозе от 2,5 мг до 7,5 мг.

45 18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный эверолимус вводят один раз в день.

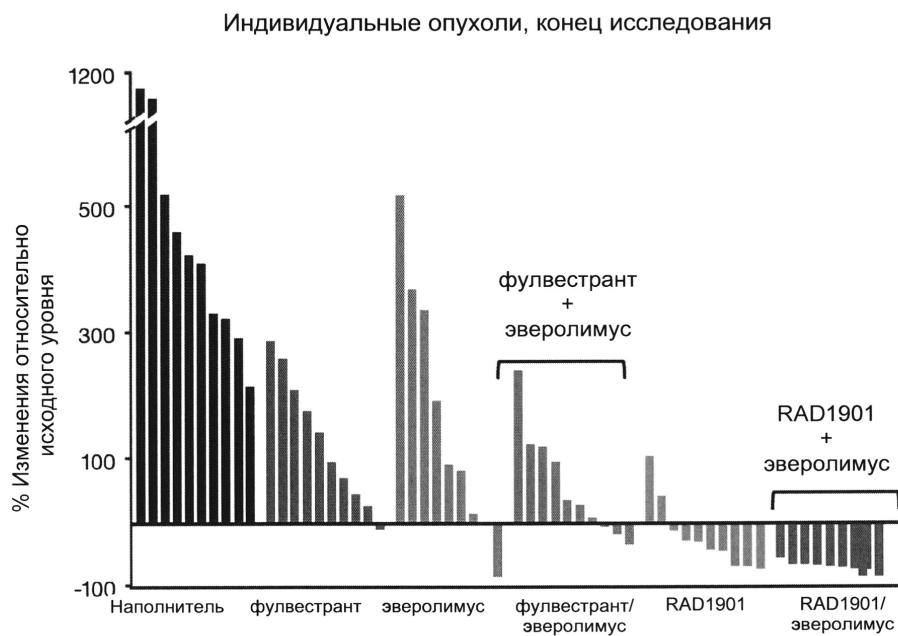
Фиг. 1

Монотерапия RAD1901						
	Модель	История приема рецептурных ЛП	ER	PR	Her2	RAD1901
Мутант ESR1	PDx-1*	Не получавшие рецептурных ЛП	+	-	+	
	PDx-2*	Не получавшие рецептурных ЛП	++	++	+	
	PDx-3*	Не получавшие рецептурных ЛП	+++	+++	+	
	PDx-4*	Не получавшие рецептурных ЛП	+++	+++	-	
	PDx-5	ИА	Y537S, ++	+++	+	
	PDx-6	там, ИА, фулвестрант	Y537S, ++	+++	+	
Высокий уровень ER+/Her2	PDx-7	Не получавшие рецептурных ЛП	++	-	++	
	PDx-8	Her2и, там, бевацизумаб, химио	+	-	+++	
	PDx-9	там, ИА, химио	+	-	+++	
	PDx-10	ИА, ритуксимаб, химио	++	-	++	
	PDx-11	ИА, фулвестрант, химио	+++	+++	++	
	PDx-12*	Не получавшие рецептурных ЛП	++	++	++	

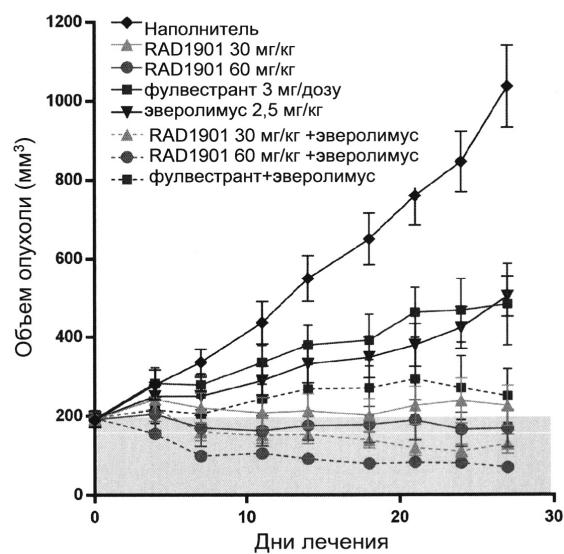
Фиг. 2А



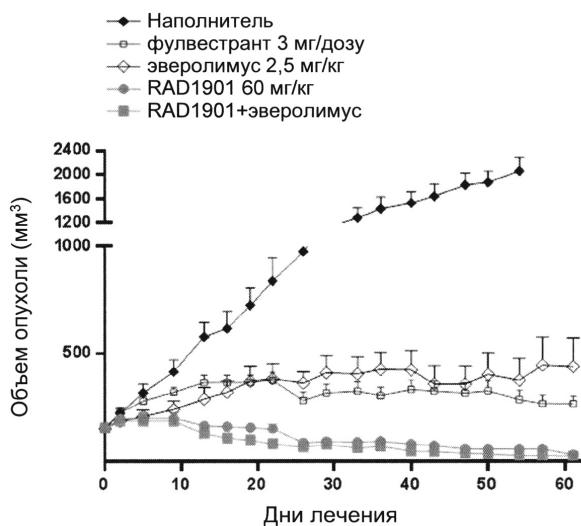
Фиг. 2В



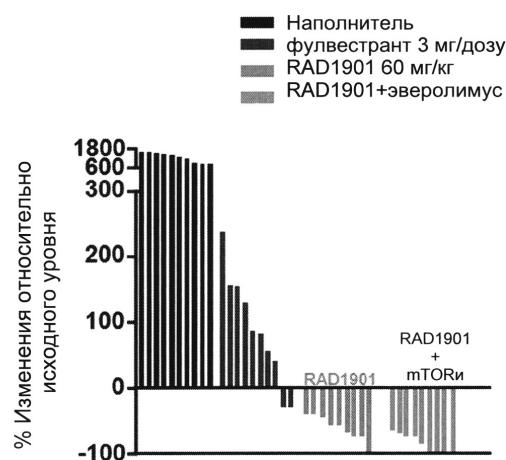
Фиг. 2С



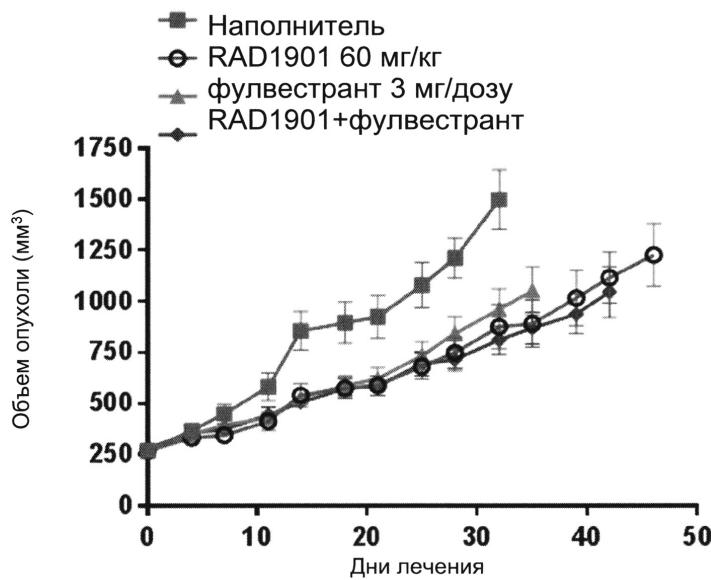
Фиг. 3А



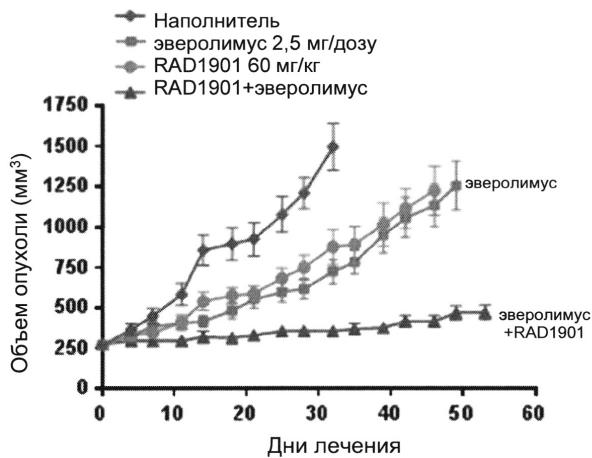
Фиг. 3В



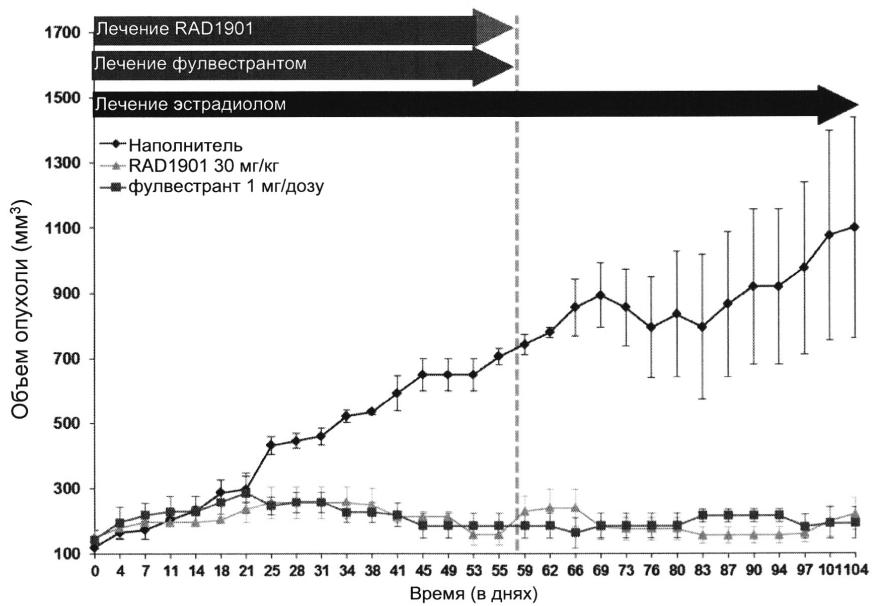
Фиг. 4А



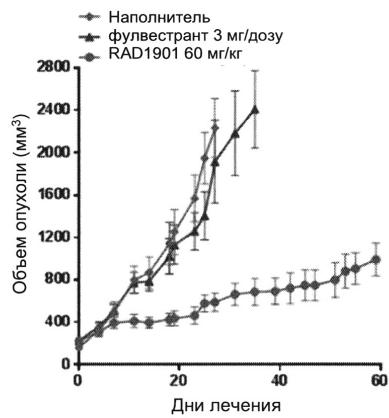
Фиг. 4В



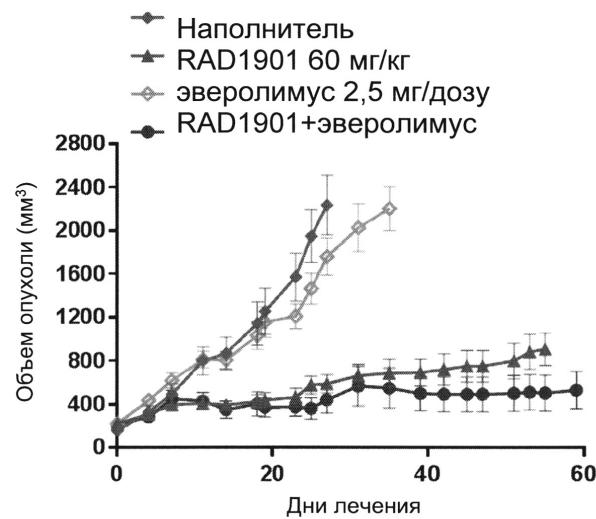
Фиг. 5



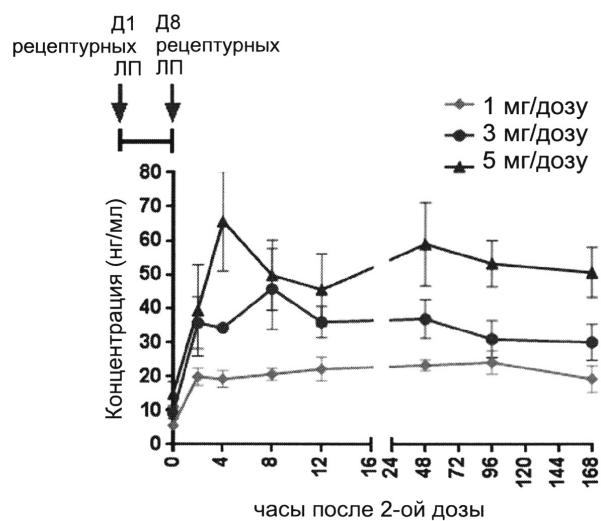
Фиг. 6А



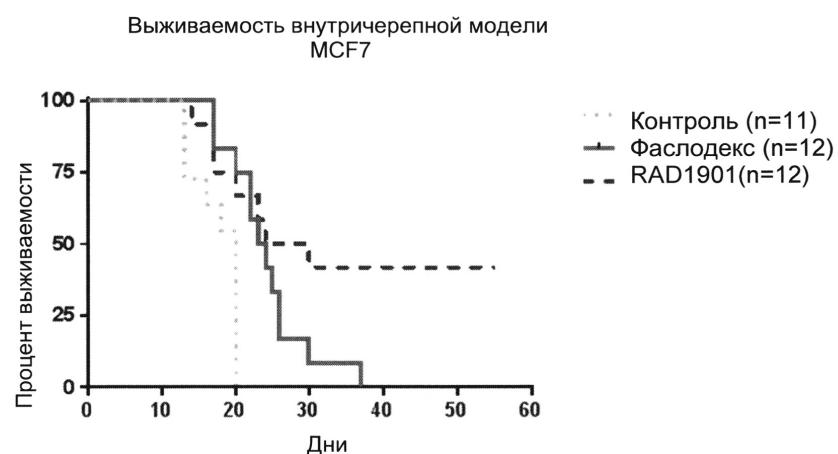
Фиг. 6В



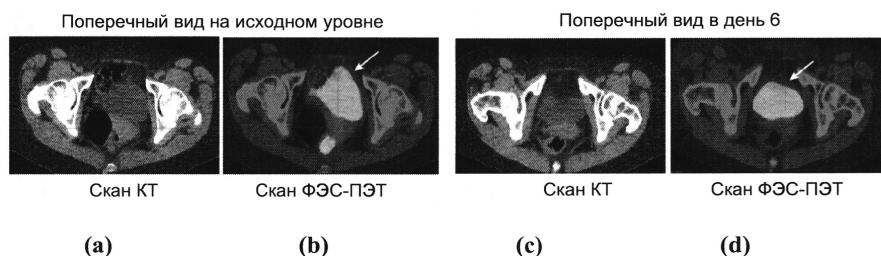
Фиг. 7



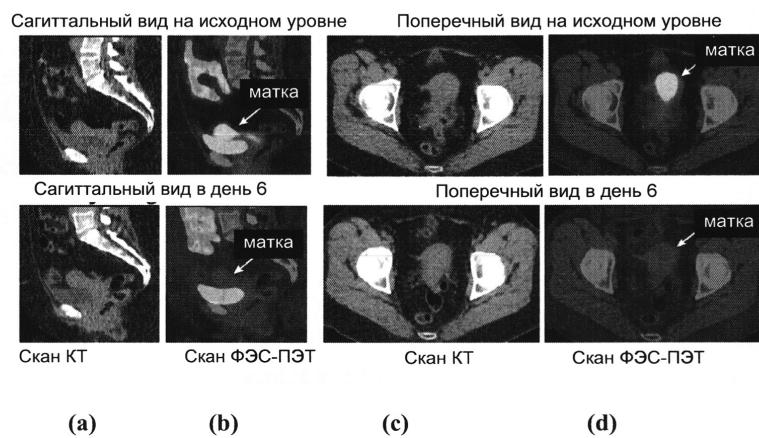
Фиг. 8



Фиг. 9А

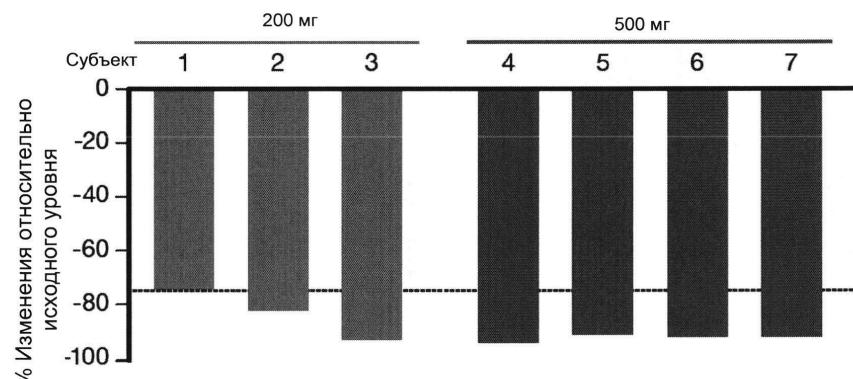


Фиг. 9В

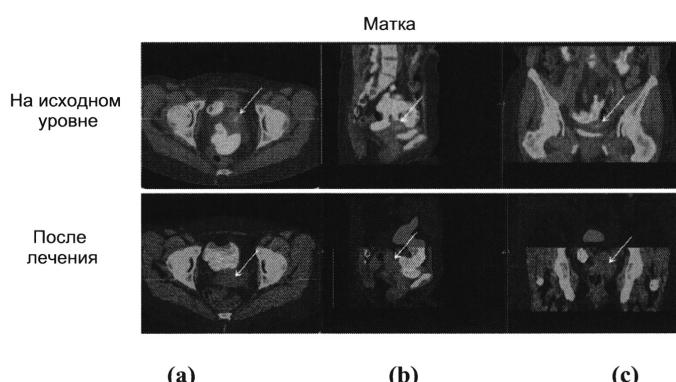


12 / 62

Фиг. 9С



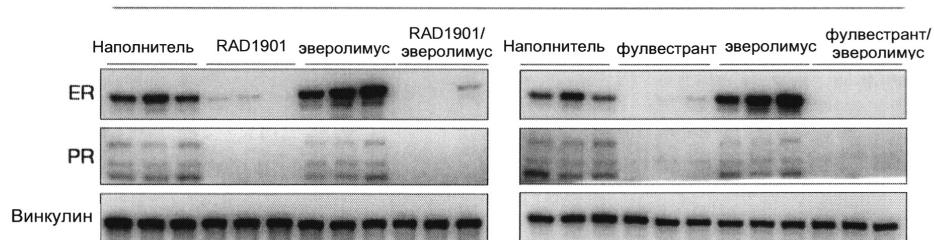
Фиг. 10А



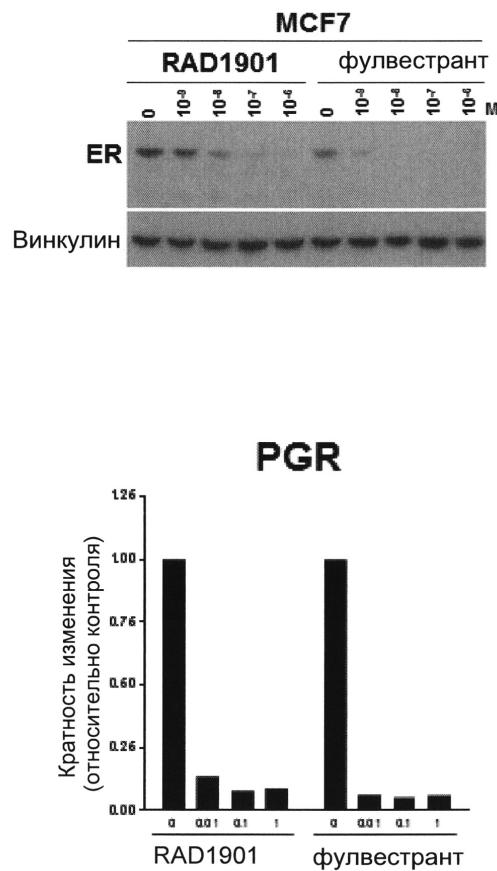
Фиг. 10В



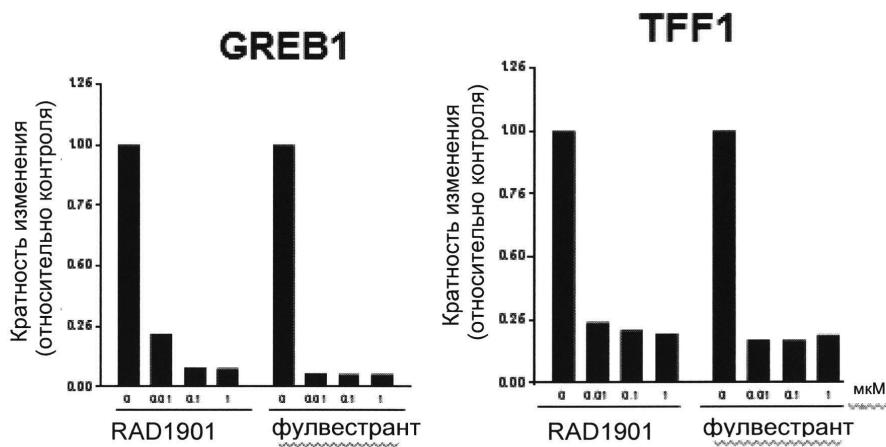
Фиг. 11



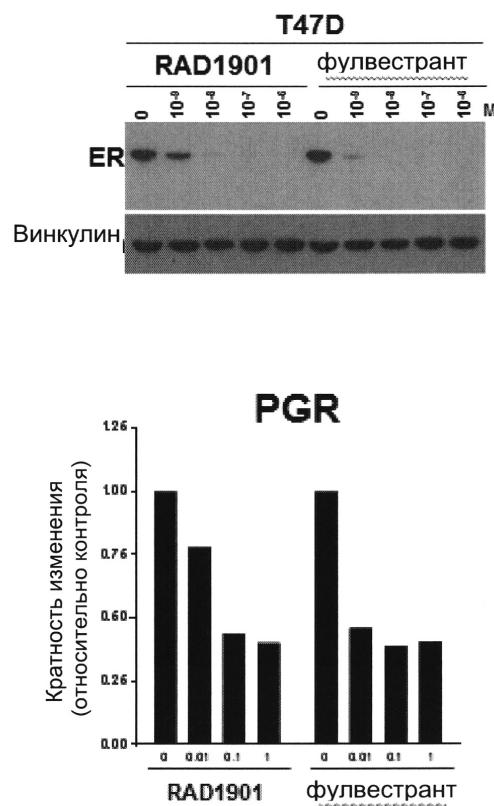
Фиг. 12A



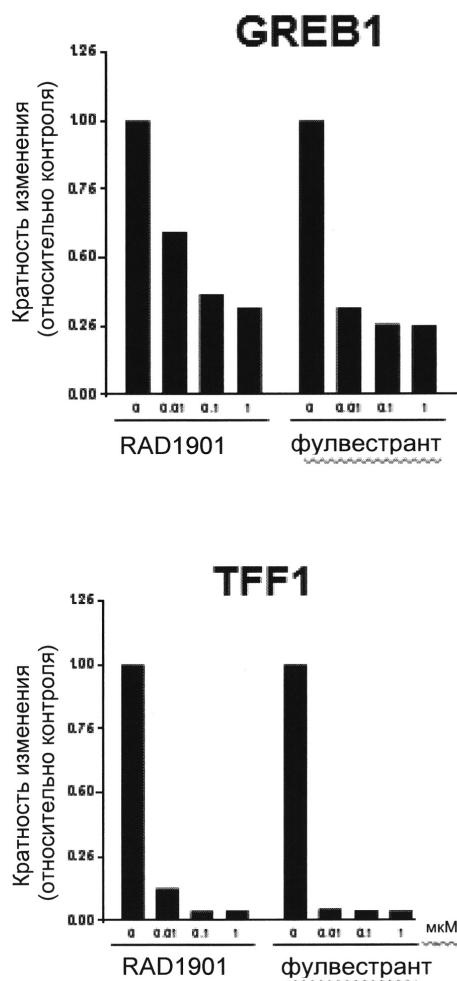
Фиг. 12А (продолжение)



Фиг. 12В

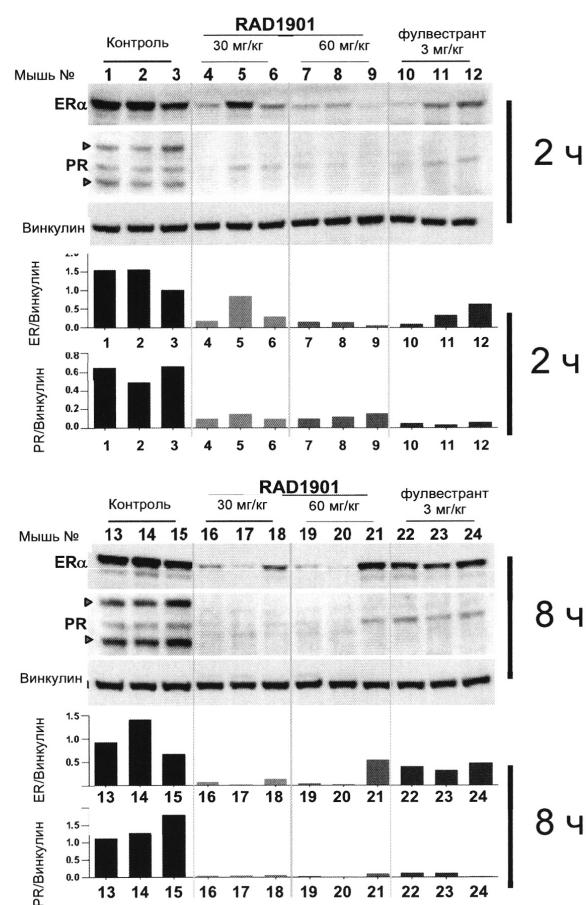


Фиг. 12В (продолжение)

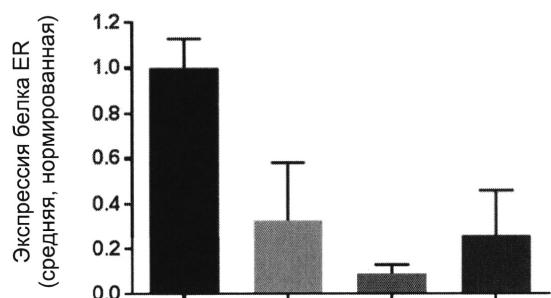


19 / 62

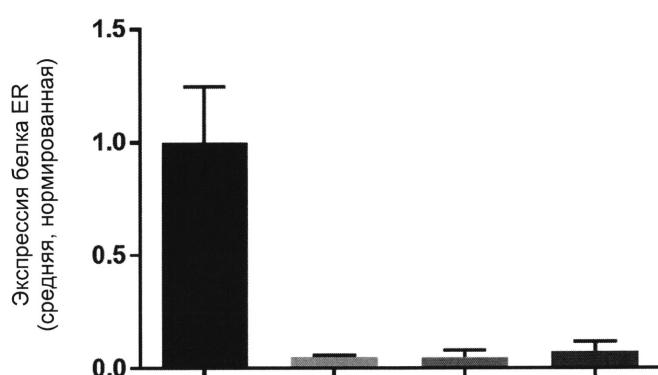
Фиг. 13А



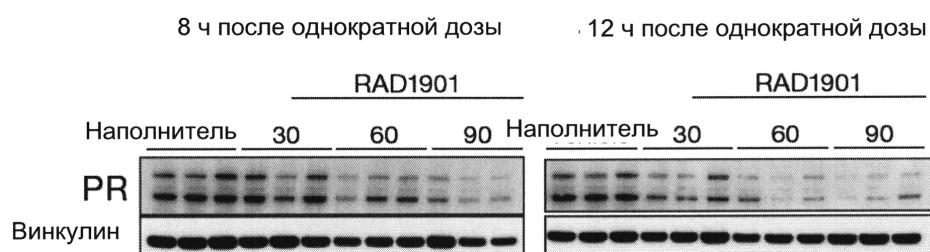
Фиг. 13В



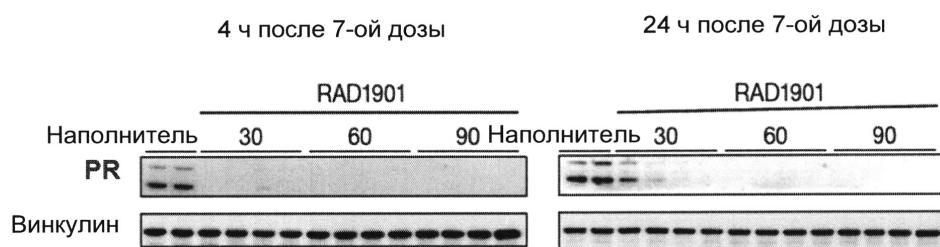
Фиг. 13С



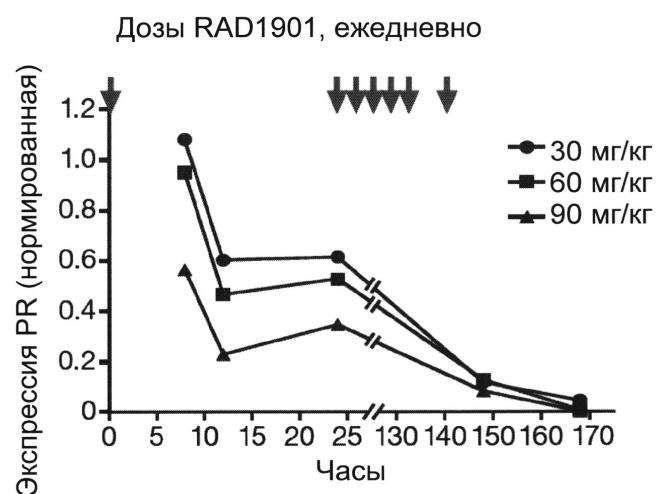
Фиг. 14А



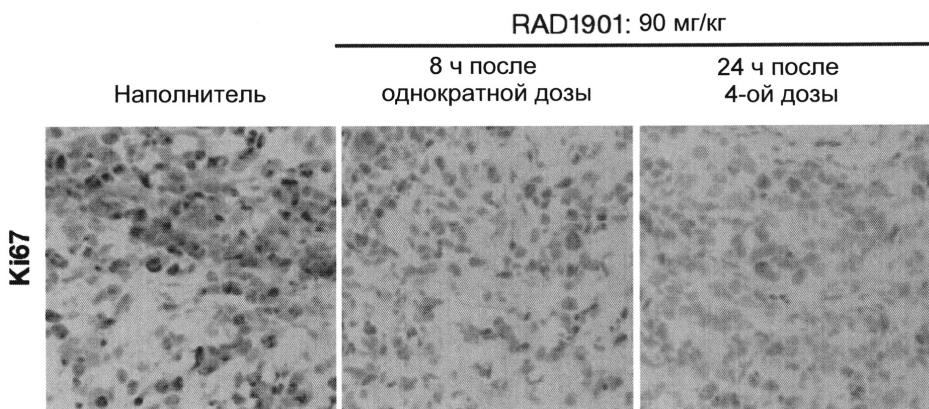
Фиг. 14Б



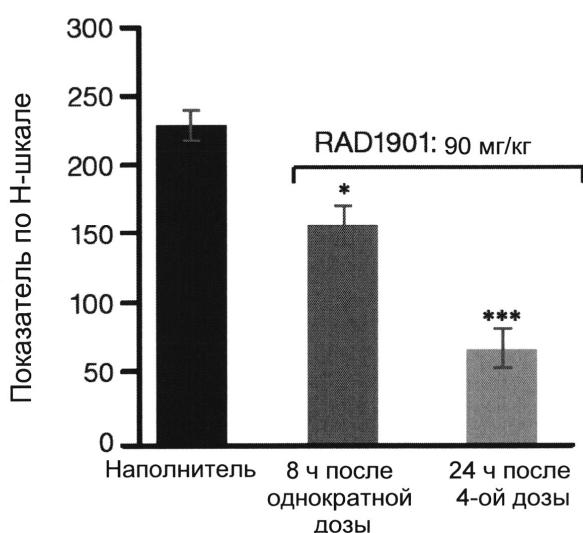
Фиг. 14С



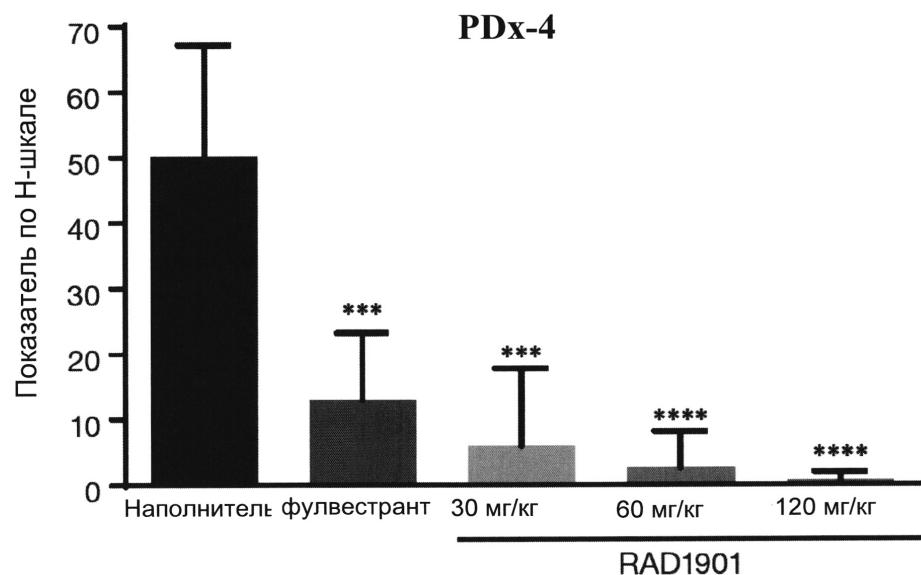
Фиг. 15А



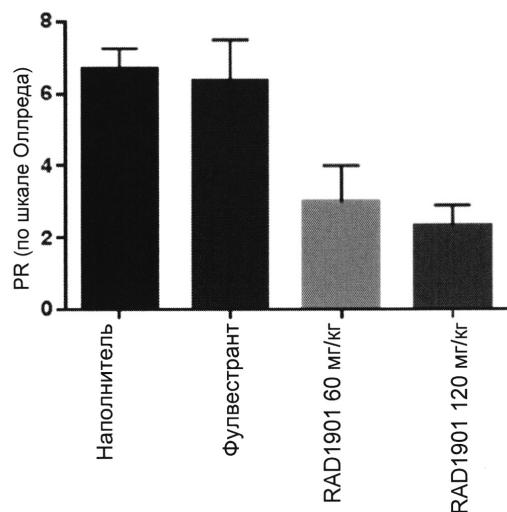
Фиг. 15В



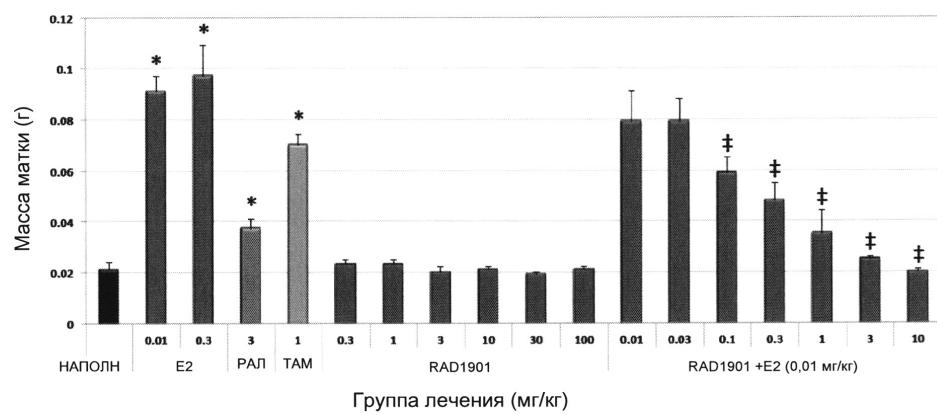
Фиг. 16



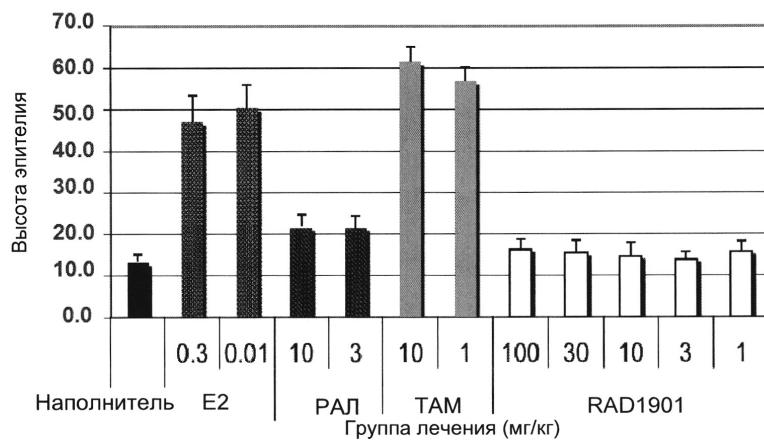
Фиг. 17



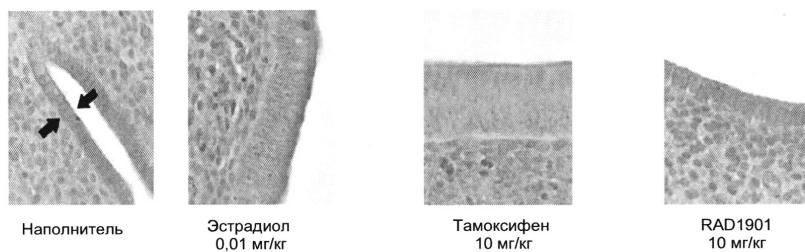
Фиг. 18А



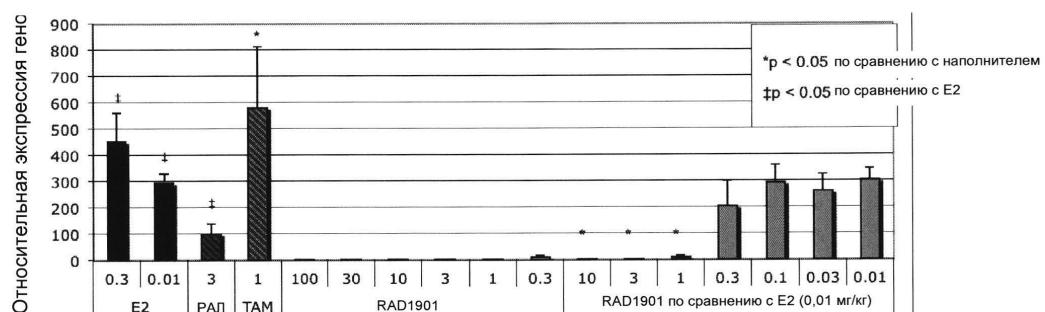
Фиг. 18В



Фиг. 18С

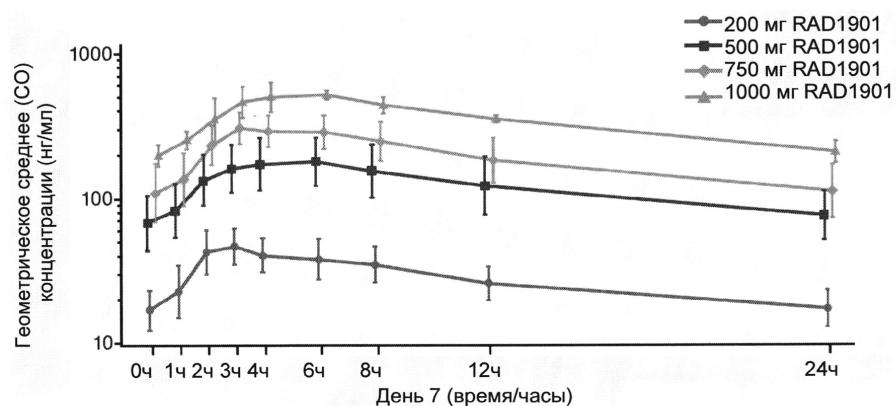


Фиг. 18D

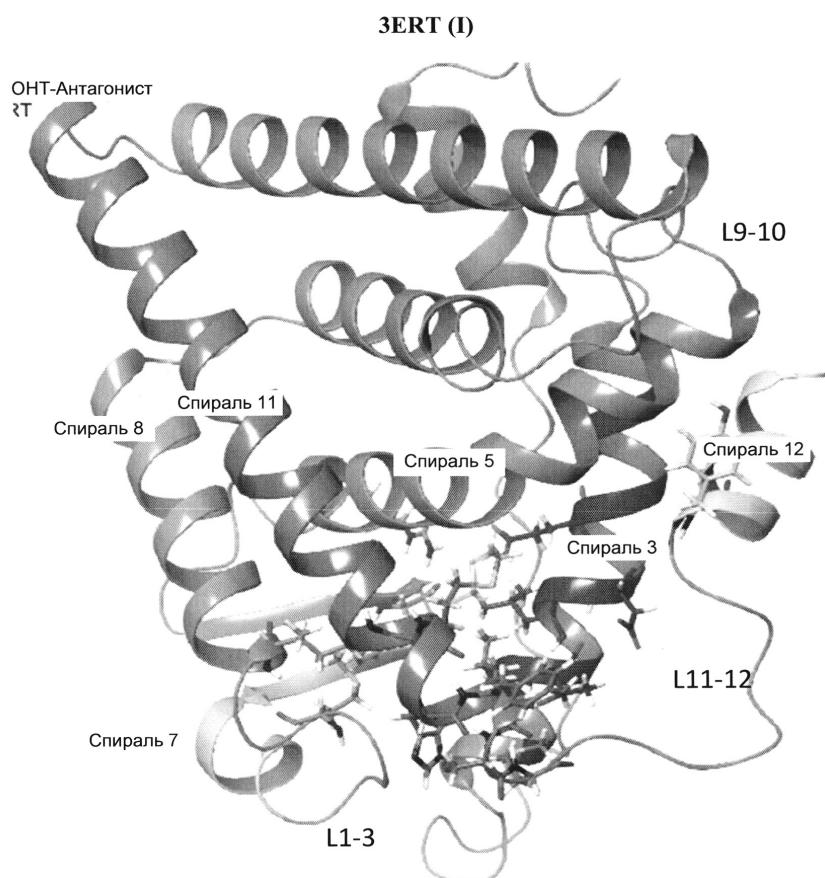


27 / 62

Фиг. 19

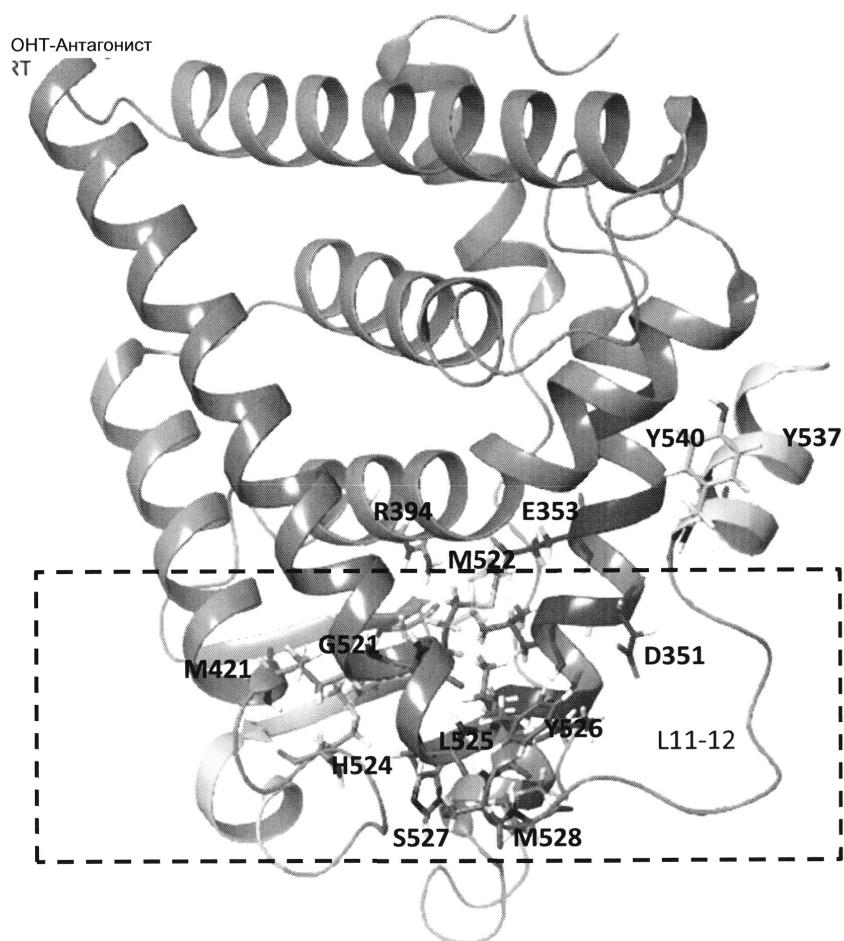


Фиг. 20

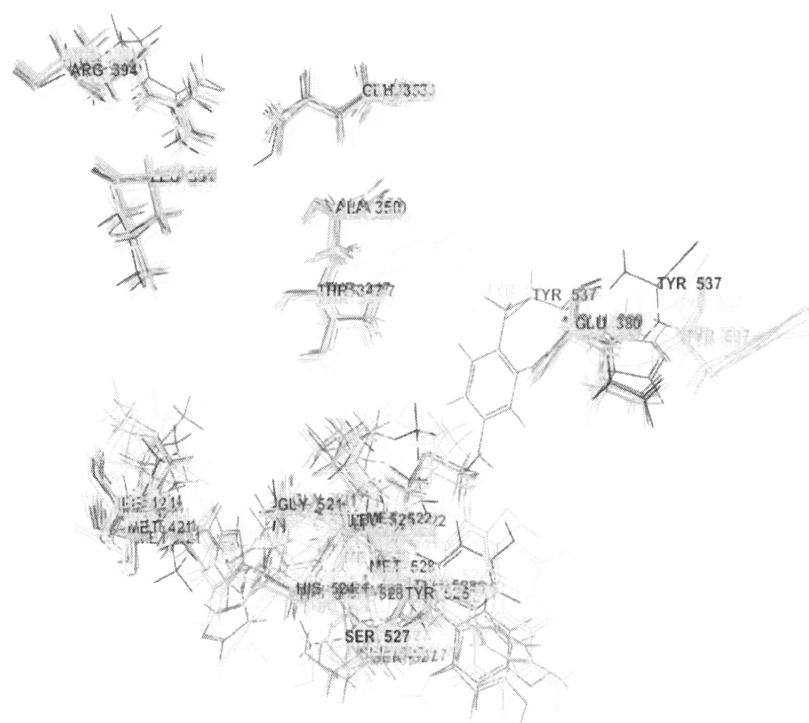


Фиг. 21

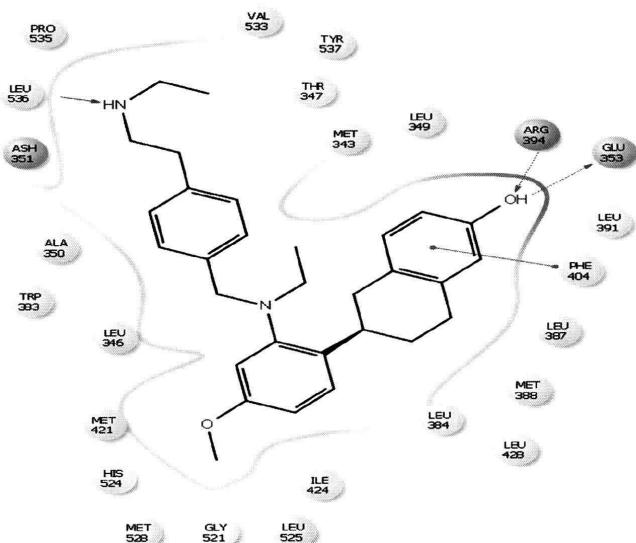
3ERT (II)



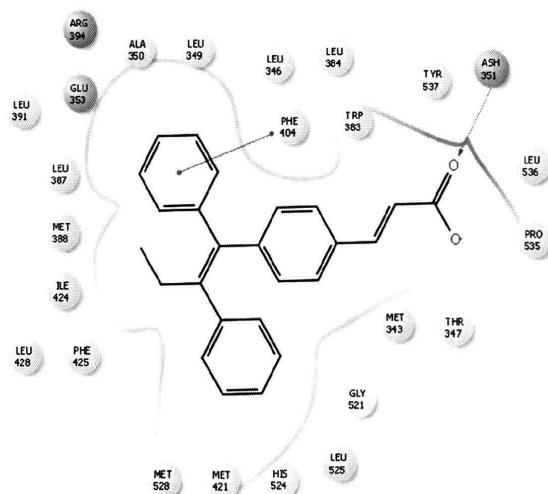
Фиг. 22



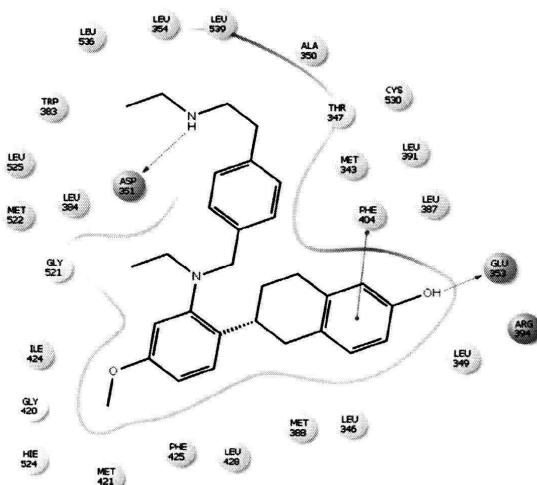
Фиг. 23А



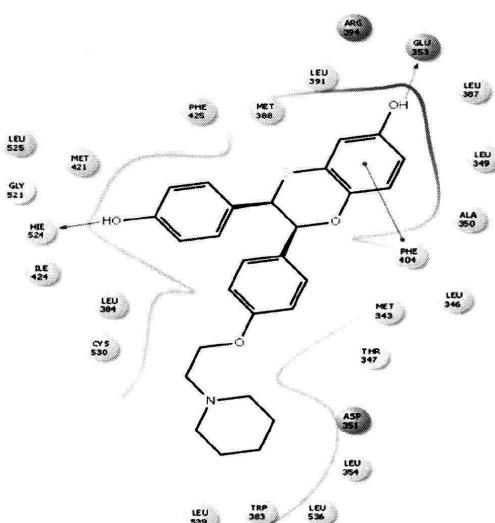
Фиг. 23В



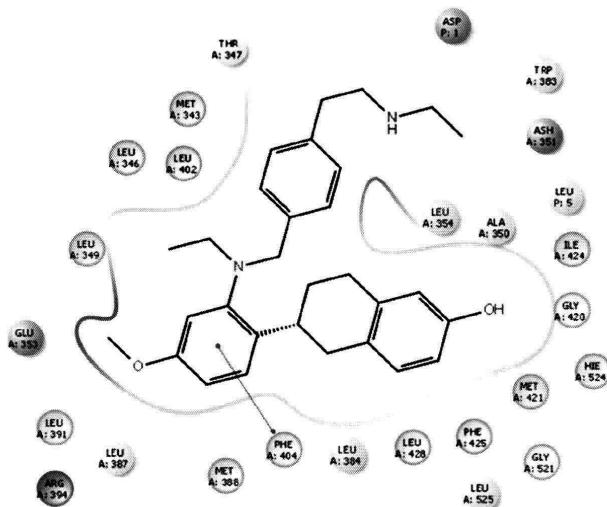
Фиг. 24А



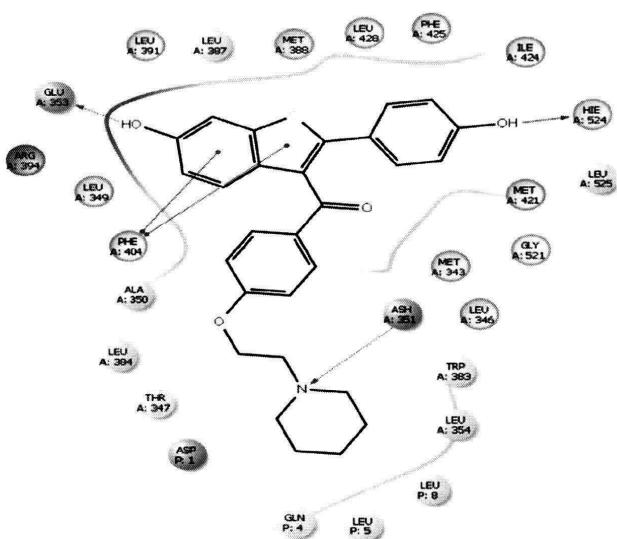
Фиг. 24В



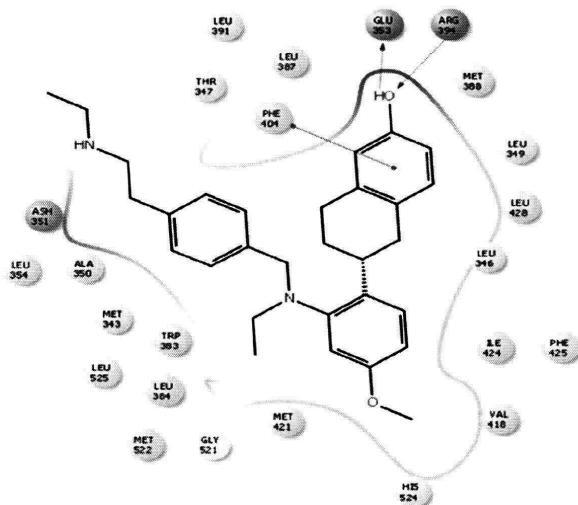
Фиг. 25А



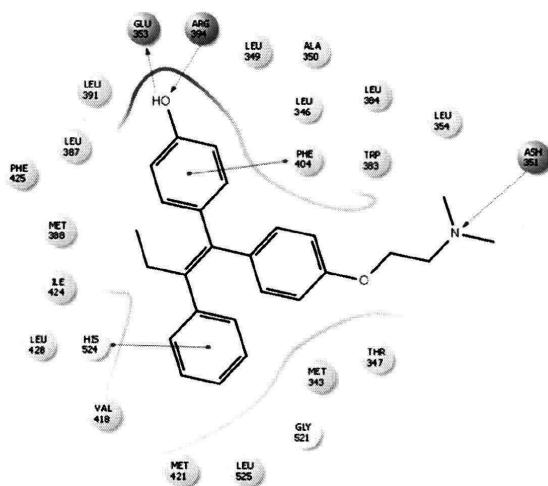
Фиг. 25В



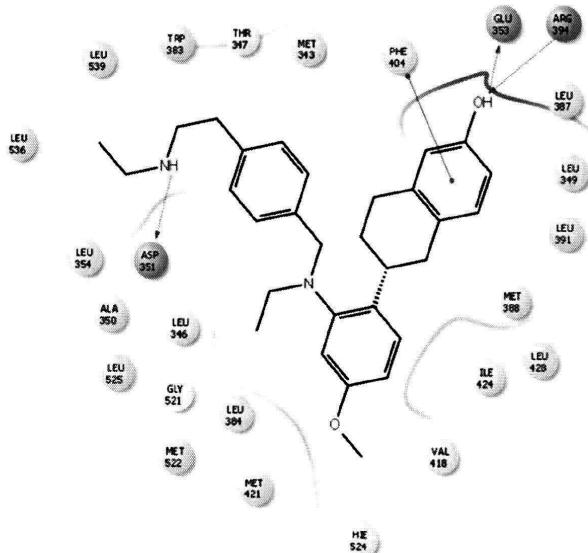
Фиг. 26А



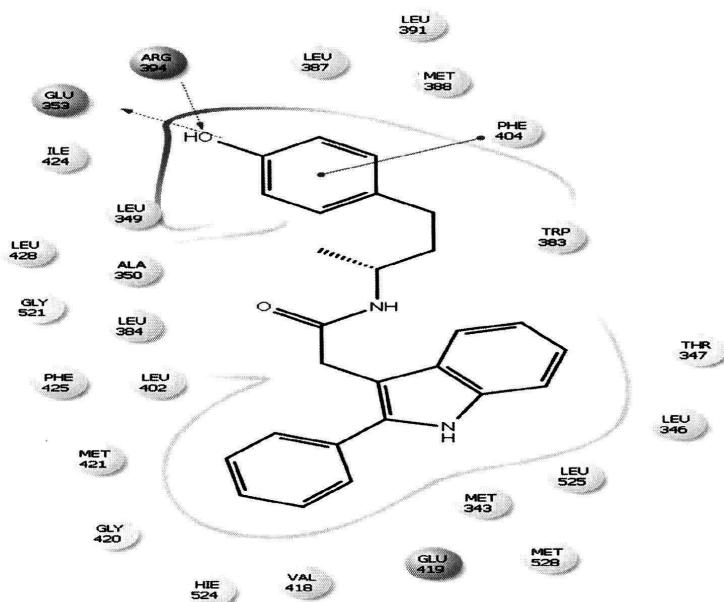
Фиг. 26В



Фиг. 27А

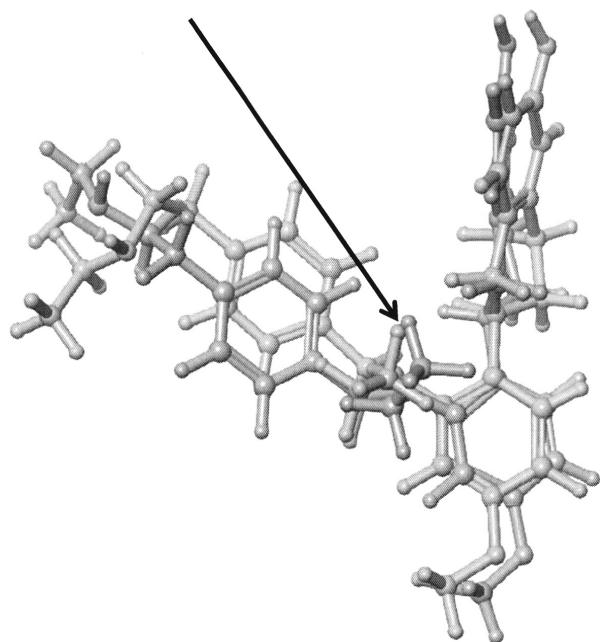


Фиг. 27В



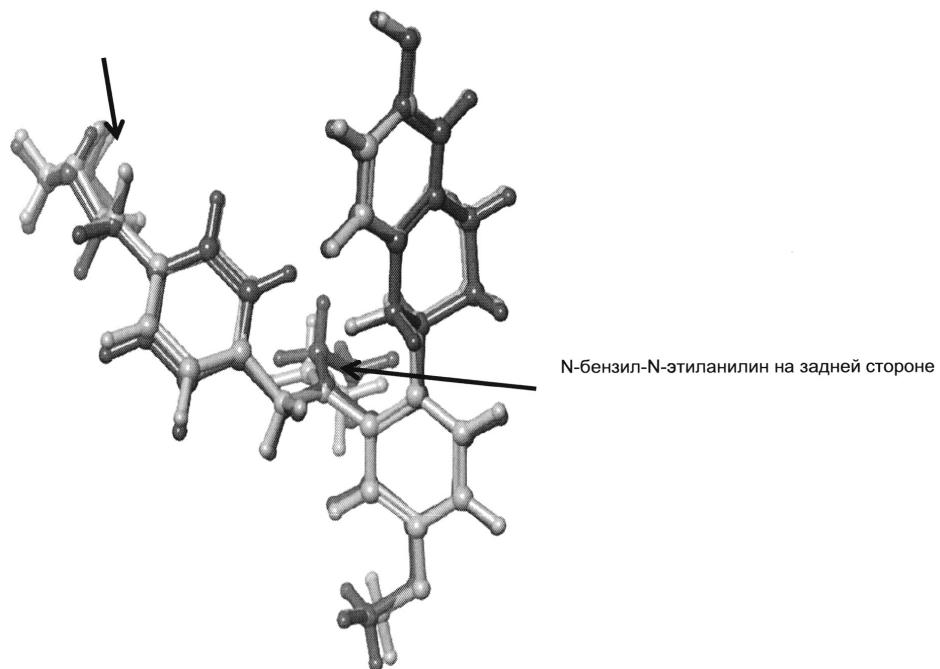
Фиг. 28

N-бензил-N-этиланилин на передней стороне

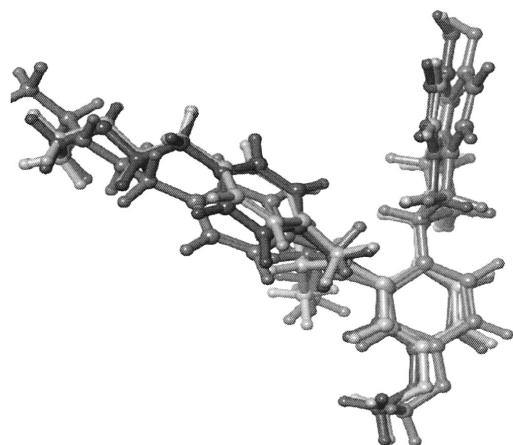


Фиг. 29

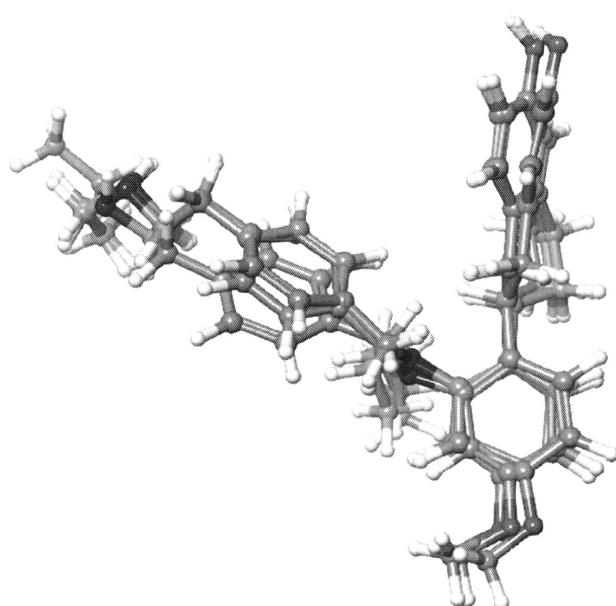
Этиламино-этил



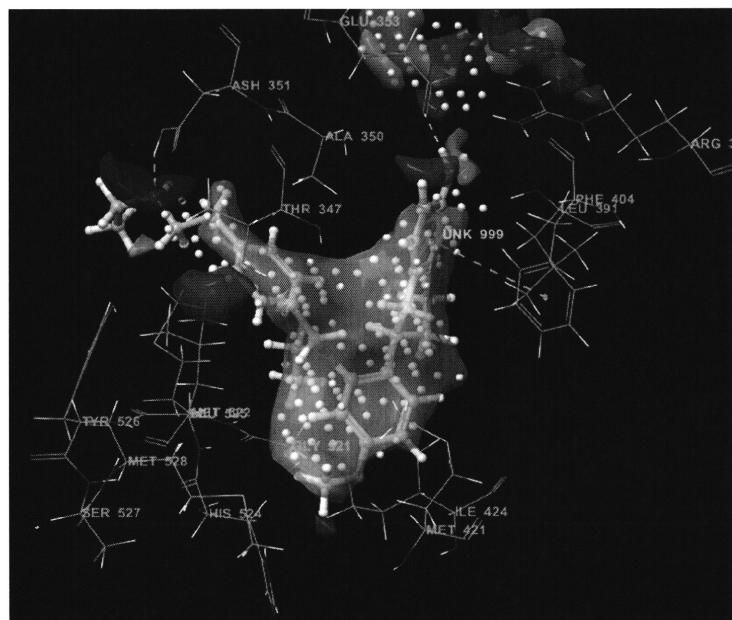
Фиг. 30А



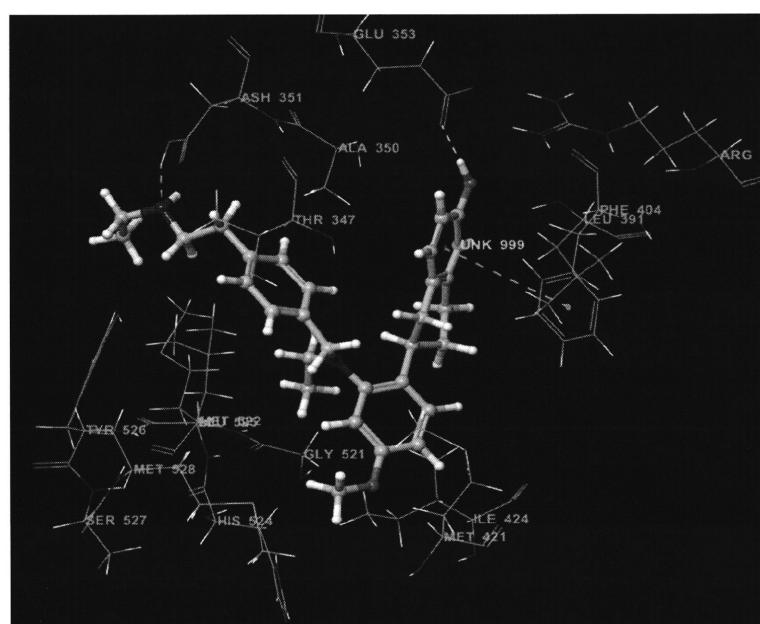
Фиг. 30В



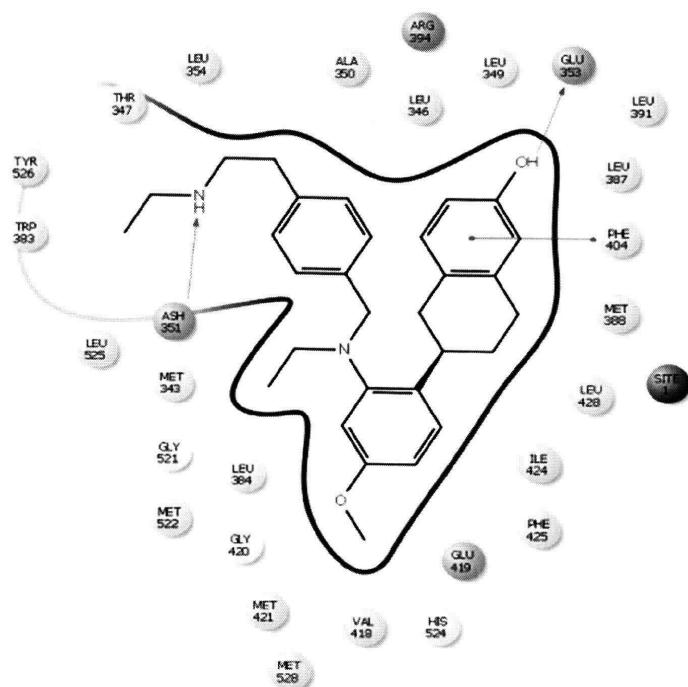
Фиг. 31А



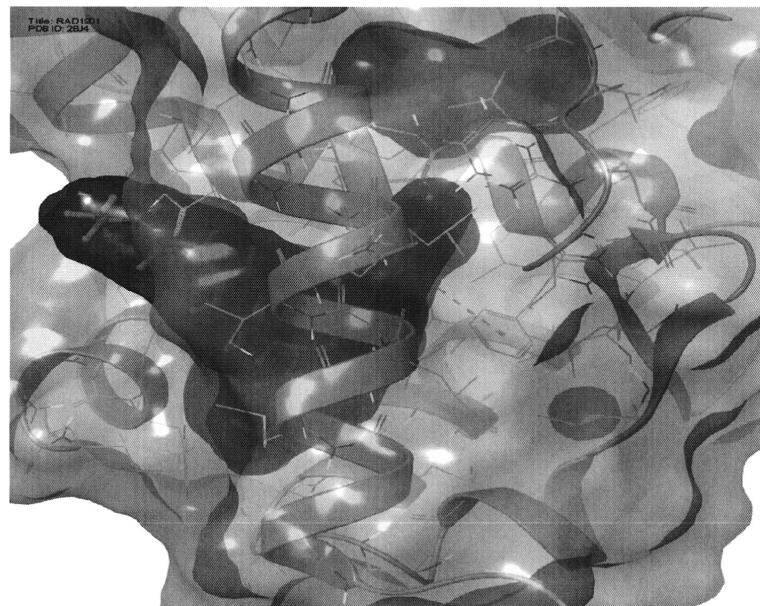
Фиг. 31В



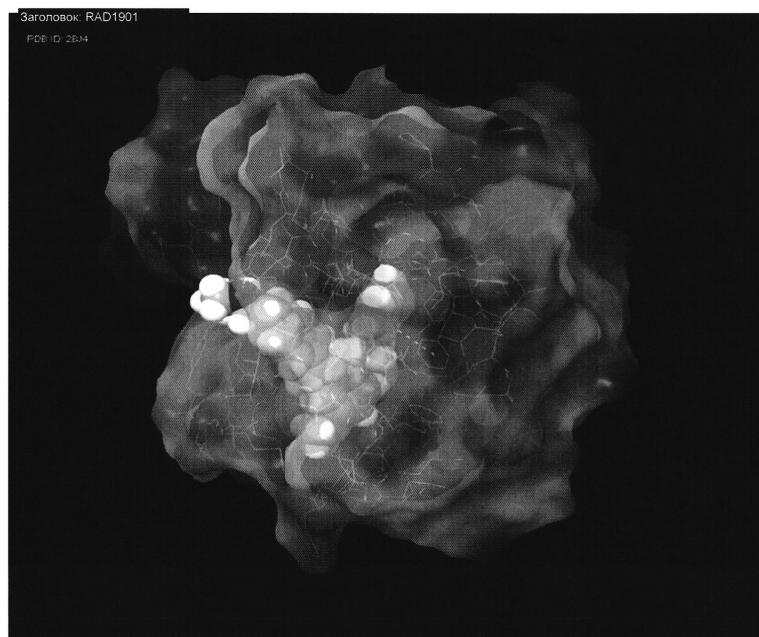
Фиг. 31С



Фиг. 32А

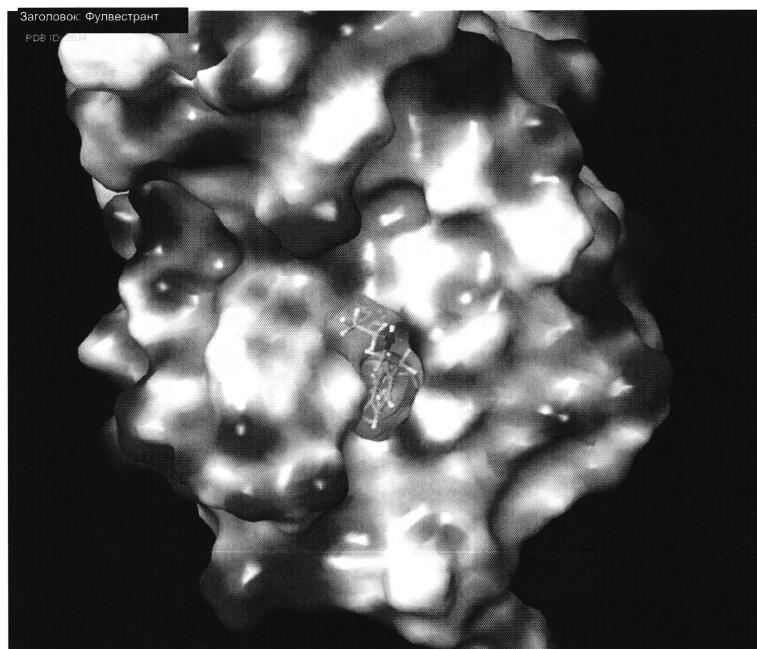


Фиг. 32В

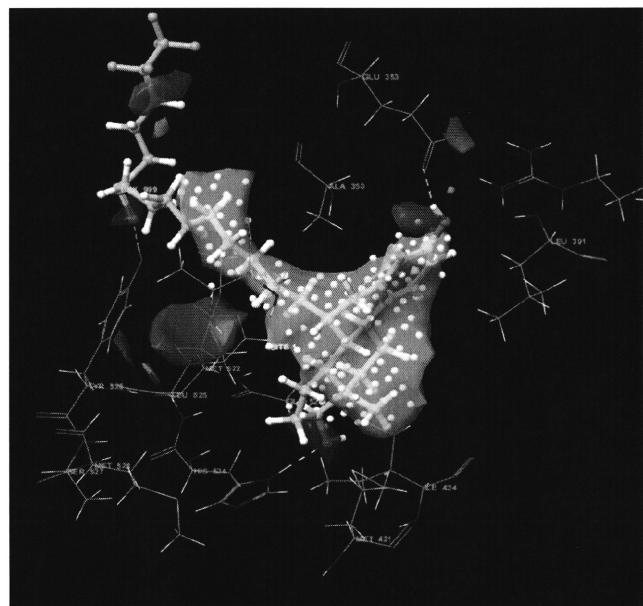


42 / 62

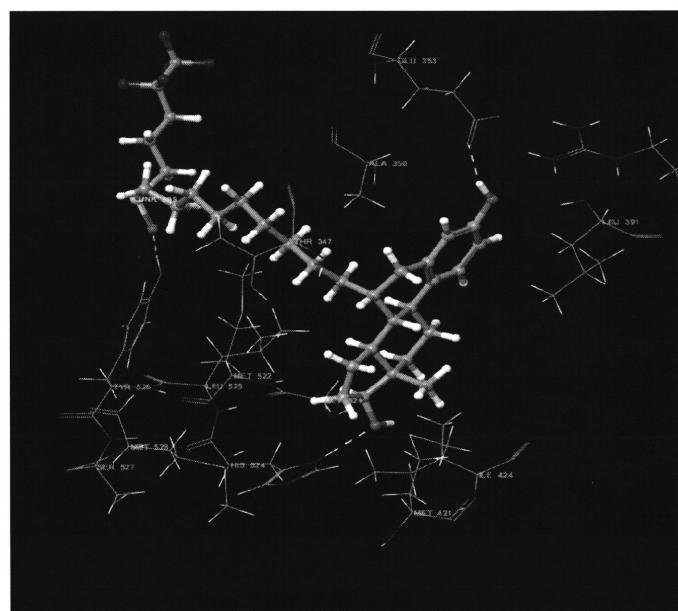
Фиг. 32С



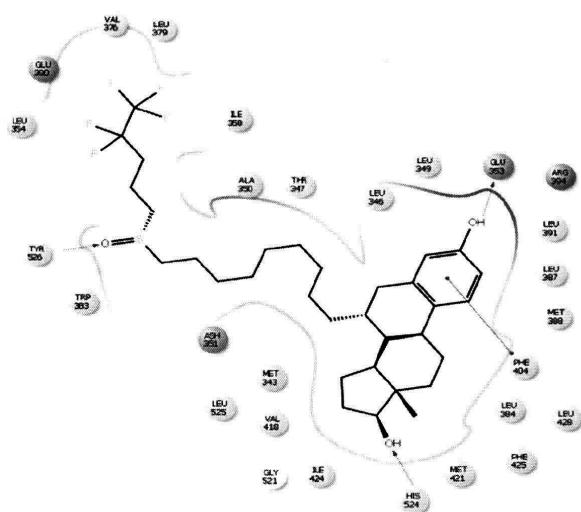
Фиг. 33А



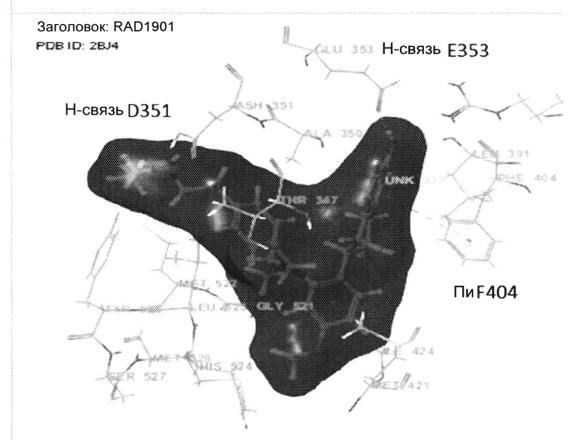
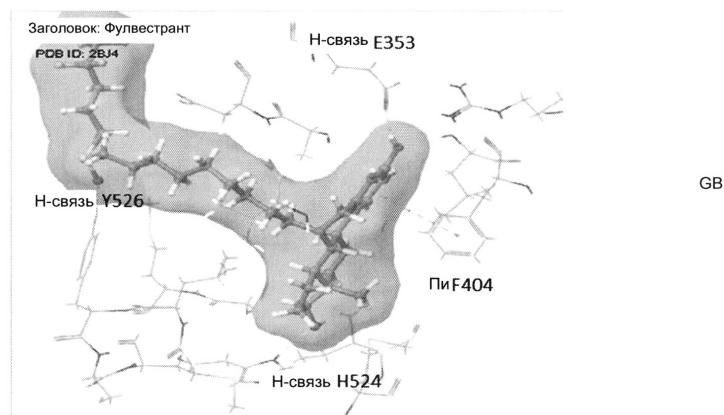
Фиг. 33В



Фиг. 33С

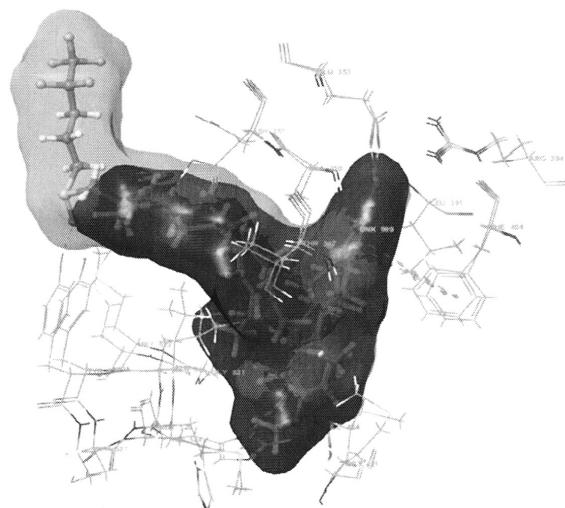


Фиг. 34А

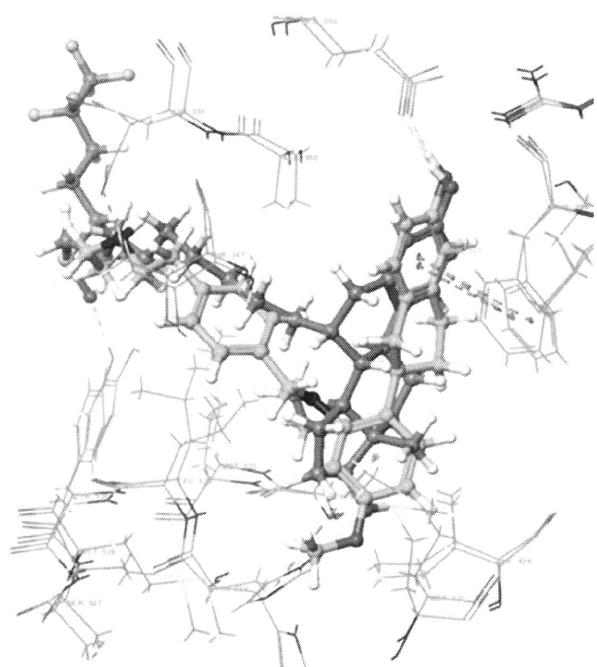


Фиг. 34В

Фиг. 35А



Фиг. 35В



Фиг. 36

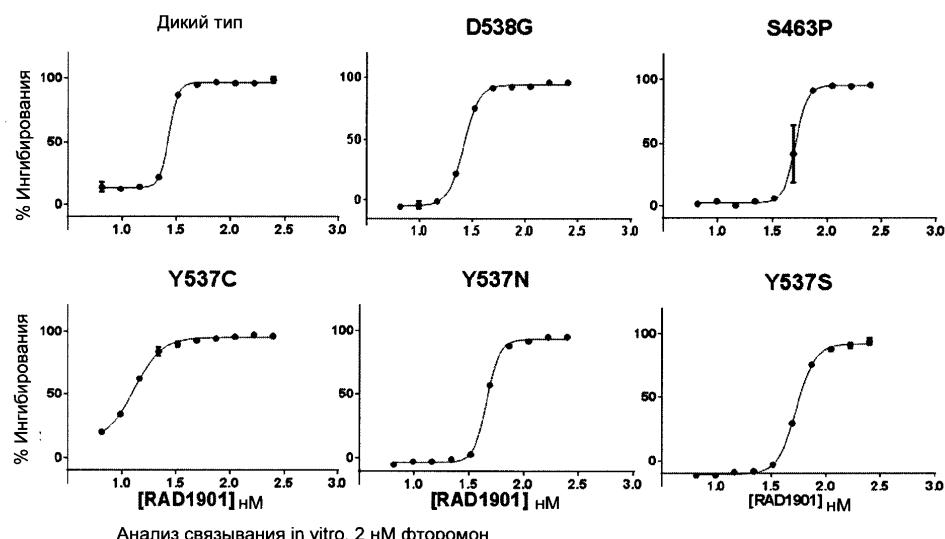


Таблица 1

Уровень RAD1901 в плазме, опухоли и головном мозге мышей, которым имплантировали клетки MCF7, после лечения в течение 40 дней

	Доза (мг/кг)	Плазма (нг/мл)	Опухоль (нг/мл)	Головной мозг (нг/мл)	Соотно шение ГМ/П	Соотношение О/П
Наполнитель		НПКО *	НПКО	НПКО	-	-
RAD1901	0,3	2	11	НПКО	-	
RAD1901	1	3	45	НПКО	-	
RAD1901	3	9	169	7	0,78	18,78
RAD1901	10	39	757	14	0,36	19,41
RAD1901	30	137	3875	72	0,53	28,28
RAD1901	60	334	11117	201	0,60	33,28

* НПКО: ниже предела количественного определения

Таблица 2

СУН для матки, мышц и костей для субъекта-человека, получавшего лечение дозой 200 мг п.о. о.р.д. в течение шести дней

Доза	СУН, матка, % изменения	СУН, кости, % изменения	СУН, мышцы, % изменения
200 мг	-85%	16%	0%

Таблица 3

СУН для матки, мышц и костей для субъектов-людей (n=4), получавших лечение дозой 500 мг п.о. о.р.д. в течение шести дней.

№ субъект а	Скан	СУН, матка, среднее значен ие	СУН, матка, измене ние (%)	СУН, мышцы, среднее значение	СУН, мышцы, изменение (%)	СУН, кости, среднее значение	СУН, кости, изменение (%)
1	Исходный уровень	3,88		0,33		0,36	
	День 6	0,58	-85	0,31	-6	0,48	33
2	Исходный уровень	6,47		0,25		0,49	
	День 6	0,33	-86	0,42	68	0,55	12
3	Исходный уровень	3,66		0,50		0,41	
	День 6	0,58	-84	0,31	-38	0,47	-23
4	Исходный уровень	3,35		0,30		0,40	
	День 6	0,41	-88	0,24	-20	0,52	30
Среднее значени е			-86		1		13

Таблица 4

Эффект RAD1901 в отношении МПК на крысах после овариэктомии.^a

Лечение	МПК бедренной кости (% изменения)	МПК поясничного отдела (% изменения)
Симуляция	$3,1 \pm 2,4^*$	$2,7 \pm 5,0^*$
OVX+наполи.	-5,4 ± 5,1	-10,2 ± 12,8
OVX+E2	-0,5 ± 2,6*	-2,1 ± 12,2*
OVX+RAD1901	0,4 ± 2,8*	-1,1 ± 7,9*

^aВзрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство – овариэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) о.р.д. (n=20 на группу лечения). МПК измеряли посредством двухэмиссионной рентгеновской абсорбциометрии на исходном уровне и после 4 недель лечения. Данные выражены в виде среднего значения ± СО (стандартное отклонение). *P < 0,05 по сравнению с соответствующим OVX (овариэктомия) + Контроль наполи. МПК, минеральная плотность костей; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариэктомии; Наполи, наполнитель.

Таблица 5

Эффект RAD1901 в отношении микроархитектуры бедренной кости на крысах после овариоэктомии^a

Лечение	OK/O O (%)	ПлотнСоед (1/мм ³)	ЧТ (1/м м)	TT (мм)	PMT (мм)	KPK (мг гидроксиапатита/см ³)
Симуляция	0,394 ± 0,069*	138 ± 21* 0,6*	5,2 ± ±	0,095 0,008	0,175 0,029	456 ± 61* * *
OVX+Наполи.	0,234 ± 0,065	91 ± 32 0,9	3,5 ± ±	0,085 0,011	0,307 0,086	301 ± 69
OVX+E2	0,309 ± 0,079*	125 ± 25* 0,8*	4,8 ± ±	0,086 0,008	0,204 0,054	379 ± 75* * *
OVX+RAD190 1	0,300 ± 0,066*	113 ± 22* 0,8*	4,5 ± ±	0,088 0,008	0,218 0,057	370 ± 66* * *

^aВзрослым самкам крыс проводили симуляцию или хирургическое вмешательство – овариоэктомию перед началом лечения наполнителем, E2 (0,01 мг/кг) или RAD1901 (3 мг/кг) о.р.д. (n=20 на группу лечения). Через 4 недели микроархитектуру кости оценивали с применением компьютерной микротомографии. Данные выражены в виде среднего значения ± СО. *P < 0,05 по сравнению с соответствующим OVX+Контроль наполн. КПК, кажущаяся плотность костей; OK/OO, плотность объема костей; ПлотнСоед, плотность соединительной ткани; E2, бета-эстрадиол; OVX, после овариоэктомии; ЧТ, число трабекул; ТТ, толщина трабекул; PMT, расстояние между трабекулами; Наполи, наполнитель

Таблица 6

**Ключевые демографические характеристики на исходном уровне исследования 1
фазы с увеличением дозы RAD1901**

	Плацебо (N=8)	200 мг RAD1901 (N=15)	500 мг RAD1901 (N=14)	750 мг RAD1901 (N=8)	1000 мг RAD1901 (N=7)
Белая раса (% от когорты)	8(100)	14(93)	10(71)	8(100)	7(100)
Средний возраст, лет	64	62	59	64	64
Среднее значение ИМТ, кг/м²	26,1	25	24,4	24,9	26,7

Таблица 7
Наиболее частые (>10%) связанные с лечением НЯ (нежелательные явления) в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901

	Плацебо N=8 n(%)			200 мг N=15 n(%)			500 мг N=14 n(%)			750 мг N=8 n(%)			1000 мг N=7 n(%)			Всего активных N=44 n(%)		Всего N=44 n(%)			
	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	Степ енъ 3	Степ енъ 1	Степ енъ 2	
Тошнота	2(25)	0	0	5(33)	0	0	3(21)	2(14)	0	2(25)	1(13)	0	4(57)	2(29)	0	14(32)	5(11)	0	19(43)	0	
Дисцепсия	1(13)	0	0	3(20)	0	0	5(36)	2(14)	0	4(50)	0	0	1(14)	1(14)	0	13(30)	3(7)	0	16(36)	0	
Рвота	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	5(36)	1(7)	0	2(25)	0	0	3(43)	0	0	3(7)	10(23)	1(2)	14(32)	2
Прилив	1(13)	0	0	2(13)	0	0	6(43)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	0	0	11(25)	0	0	0	11(25)	0
Боль в области живота	1(13)	0	0	2(13)	2(13)	0	3(21)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	1(14)	0	7(16)	3(7)	0	10(23)	3	
Боль в пищеводе	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	3(21)	0	1(13)	0	0	1(14)	1(14)	1(14)	3(7)	6(14)	1(2)	10(23)	3	
Головная боль	0	0	0	3(20)	0	0	1(7)	1(7)	0	3(38)	0	0	2(29)	0	0	9(20)	1(2)	0	10(23)	3	
Икота	0	0	0	1(7)	0	0	4(29)	0	0	2(25)	0	0	2(29)	0	0	9(20)	0	0	0	9(20)	0
Гиперсекр етия слюны	0	0	0	2(13)	0	0	2(14)	0	0	2(25)	0	0	2(29)	0	0	8(18)	0	0	0	8(18)	0
Диарея	1(13)	0	0	0	0	0	3(21)	0	0	0	0	0	3(43)	1(14)	0	6(14)	1(2)	0	7(16)	0	
Дисфагия	0	0	0	0	0	0	1(7)	2(14)	0	3(38)	1(13)	0	0	0	0	4(9)	3(7)	0	7(16)	0	
Опушение чужеродно го тела	0	0	0	2(13)	0	0	1(7)	0	0	0	0	0	4(57)	0	0	7(16)	0	0	0	7(16)	0

Таблица 7 (продолжение)

Вздутие живота	0	0	0	1(7)	1(7)	0	1(7)	0	0	1(13)	0	0	2(29)	0	0	5(11)	1(2)	0	6(14)
Одинфаг ия	0	0	2(13)	0	0	1(7)	0	0	0	0	0	0	1(14)	1(14)	0	4(9)	2(5)	0	6(14)
Головокру жение	2(25)	0	1(7)	0	0	2(14)	0	0	1(13)	0	0	1(14)	0	0	5(11)	0	0	0	5(11)
Неприятн ые ощущения в животе	0	0	3(20)	0	0	0	0	1(13)	1(13)	0	0	0	0	0	4(9)	1(2)	0	5(11)	
Метеоризм	0	0	2(13)	0	0	2(14)	0	0	1(13)	0	0	0	0	0	5(11)	0	0	0	5(11)
Боль в мышцах	1(13)	0	0	2(13)	1(7)	0	0	1(7)	0	1(13)	0	0	0	0	3(7)	2(5)	0	5(11)	

Таблица 8

Фармакокинетические параметры в исследовании 1 фазы с увеличением дозы RAD1901 (день 7)

Параметр	Статистические данные	200 мг N=15	500 мг N=11	750 мг N=6	1000 мг N=3
C _{max} (нг/мл)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	49,8 30,6, 85,5	197 105, 316	322 248, 420	540 481, 602
t _{max} (ч)	Медиана, минимум, максимум	3,00 2,00, 6,00	4,00 2,00 – 6,02	3,00 3,00, 4,00	4,00 3,00, 6,00
AUC _{0-tau} (ч*нг/мл)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	670 418, 1181	2927 1562, 5460	4614 3209, 7183	8292 7281, 8947
t _{1/2} (ч)	Геометрическое среднее, минимум, максимум	38,3 27,7, 51,4	37,5 33,8, 41,3	38,4 34,6, 46,4	42,3 38,7, 49,4

Таблица 9**Частота мутаций ЛСД**

	Частота (%)
D538G	29,5
Y537S	25,0
Y537N	13,6
Y537C	9,1
E380Q	6,8
S463P	4,5
L536R	2,3
L536Q	2,3
P535H	2,3
V392I	2,3
V534E	2,3

Таблица 10

Различия комплексов ЛСД ER- α – антагонист в положениях остатков по сравнению с 3ERT

№ основани я/PDB	L1- 3/Спира ль 8		Сpirаль 11								Спир аль 5	Сpirаль 12	
	M4 21	I4 24	E5 21	M5 22	H5 24	L5 25	Y5 26	S5 27	M5 28	E380	Y5 37	L5 40	
2BJ4	x	x		x	x		x		x	x		NД	
2JFA	x	x		x	x		x	x	x			NД	
1SJ0	x	x	x	x	x		x	x	x				
2JF9		x		x	x	x	x	x	x			NД	
1YIM	x	x		x	x		x		x				
1R5K	x	x		x	x		x	x	X		x	x	
1UMO	x	x		x	x								
1ERR	x	x			x	x	x	x					
2IOK	x	x			x		x	x	x		x	x	
3UUC	x	x			x		x	x	x	x		x	
1YIN	x	x	x	X	x	x	x	x	x				
2AYR	x			X	x				x				
2OUZ	x	x				x			x				

Таблица 11

Оценка наложения структур комплексов ЛСД ER- α – антагонист посредством расчетов СКО:

RMSD	3ERT	2BJ4	2JFA	1SJ0	2JF9	1Y1M	1R5K	1UOM	1ERR	2IOK	3UUC	1Y1N	2AYR
3ERT													
2BJ4	0,804												
2JFA	1,196	0,554											
1SJ0	0,786	0,637	1,115										
2JF9	1,177	0,411	0,415	1,186									
1Y1M	0,978	0,687	1,118	0,276	1,072								
1R5K	1,483	0,759	0,52	1,307	0,892	1,342							
1UOM	0,739	0,761	0,723	0,489	0,909	0,499	1,115						
1ERR	1,12	0,483	0,595	1,016	0,851	1,112	1,208	0,918					
2IOK	0,824	0,689	0,787	0,899	0,897	0,854	1,208	0,736	0,838				
3UUC	1,024	0,915	0,896	1,03	0,888	1,036	1,228	1,012	0,873	0,929			
1Y1N	0,749	0,683	1,105	0,432	1,061	0,318	1,293	0,557	1,076	0,744	1,015		
2AYR	0,659	0,682	0,95	0,792	1,124	0,777	1,391	0,491	1,118	0,071	1,031	0,581	

Таблица 12**Анализ связывания лиганда в комплексах ЛСД ER- α – антагонист**

	Лиганд: связывание с	EC₅₀ (мкМ)	Примечания
3ERT	OHT: E353, R394	0,010	Зеркально отраженный амин, F404 был расположен слишком далеко от фенола, вследствие чего пи-взаимодействия отсутствовали
2BJ4	OHT: E353, R394, пи F404	0,010	
2JF9	OHT: E353, D351, H524, пи F404	0,010	
2JFA	RAL: E353, D351, H524 и пи F404 x2	0,002	
1ERR	RAL: E353, D351, R394 и пи F404 x2	0,002	Фенол, зеркально отраженный в отношении H524
1YIM	CM3: E353, H524, D351 пи F404	0,0015(IC ₅₀)	D351-карбоксил хорошо ориентировался с пирролидином
1YIN	CM3: E535, H524 пи F404	0,001	
1SJ0	E4D: E353, H524, пи F404 x 2	0,0008(IC ₅₀)	
1R5K	GW5: D351 пи F404	0,039(IC ₅₀)	Отсутствие связи якоря с E353
1UOM	PTI: E353, H524 пи F404	НД	
2IOK	IOK: E353 пи F404	0,001	
3UUC	OD1: E353, R394, T347	НД	Крайне небольшое соединение
2OUZ	C3D: E353, пи F404	0,003	
2AYR	L4G: E353, пи F404 x2	0,0107	

Таблица 13

Оценка модели для докинга RAD1901

	EC₅₀ (мкМ)	EF₅₀ (=прогностическая сила)	Может ли модель прогнозироват ь кристалличес кую структуру?	Показатель докинга лиганда	Показатель докинга RAD1901
1ERR	0,001		Нет	-11,452	-7,912
3ERT	0,002		Нет	-12,175	-8,151
3UC C	НД	8474	Да	-9,278	НД
2IOK	0,001		Да	-11,952	-10,478
1R5K	0,039	6100	Да	-11,518	-12,102
1SJ0	0,001	7511	Да	-12,507	-9,816
2JFA	0,001	6780	Да	-11,480	-11,055
2BJ4	0,002	5642	Да	-9,727	-11,971
2OU Z	0,003	--	Да	-11,789	-9,611

Таблица 14

**Показатель докинга индуцированного соответствия RAD1901 с 1R5K, 1SJ0, 2JFA,
2BJ4 и 2OUZ.**

Кристаллическая структура ER- α	Показатель докинга ДИС RAD1901
1R5K	-14,1
1SJ0	-13,1
2JFA	-13,9
2BJ4	-13,8
2OUZ	-13,4