



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.28

(21) Номер заявки
201591842

(22) Дата подачи заявки
2014.03.19

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

(31) 61/804,056

(32) 2013.03.21

(33) US

(43) 2016.01.29

(86) PCT/IB2014/059975

(87) WO 2014/147573 2014.09.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРРЭЙ БАЙОФАРМА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Капонигро Джордано, Стьюарт
Даррин (US), Де Парсеваль Лор (CH)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012095505
WO-A1-2012068468
FLAHERTY KEITH T ET AL: "Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 367, no. 18, November 2012 (2012-11), pages 1694-1703, XP002725869, ISSN: 0028-4793 the whole document

SU FEI ET AL: "Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 4, February 2012 (2012-02), pages 969-978, XP002725870, ISSN: 0008-5472 the whole document, in particular page 974, column 2

K S M SMALLEY ET AL: "Integrating BRAF/MEK inhibitors in to combination therapy for melanoma", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 100, no. 3, 20 January 2009 (2009-01-20), pages 431-435, XP055123646, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bj.C.6604891 the whole document, in particular the chapter "Conclusion"

WO-A1-03077914
JACK MCCAIN: "The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma.", P&T, vol. 38, no. 2, February 2013 (2013-02), pages 96-108, XP055093262, ISSN: 1052-1372 the whole document, in particular page 105, column 2, chapter "Combination Therapy" and chapter "Conclusion"

RYAN J. SULLIVAN ET AL: "Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, vol. 49, no. 6, 2 January

2013 (2013-01-02), pages 1297-1304, XP055082343, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.019 the whole document, in particular page 1299, column 2, first paragraph
SIMON GIROUX: "Overcoming acquired resistance to kinase inhibition: The cases of EGFR, ALK and BRAF", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 23, no. 2, January 2013 (2013-01), pages 394-401, XP055123645, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.11.037 page 399

WO-A1-2014018725
WO-A2-2006053201

E. HUILLARD ET AL: "Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A I locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 22, 14 May 2012 (2012-05-14), pages 8710-8715, XP055080274, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1117255109 the whole document, in particular page 8712 - page 8714

EP-A1-2570127

JOCELYN HOLASH: "Preclinical strategies to help better identify responder populations in the clinic", NORCAL SOT FALL SYMPOSIUM: NEW FRONTIERS IN ONCOLOGY DRUG DEVELOPMENT, 27 September 2012 (2012-09-27) XP055139652, page 8 page 17, right figure

WO-A1-2013043715

E. VERGANI ET AL: "Identification of MET and SRC Activation in Melanoma Cell Lines Showing Primary Resistance to PLX4032", NEOPLASIA, vol. 13, no. 12, December 2011 (2011-12), pages 1132-1142, XP055081482, DOI: 10.1593/neo.111102 page 1136, column 2 - page 1137, column 1 figures 5, 6 page 1141, column 1

WO-A1-2012178038

WO-A2-2009143211

"2011 International Melanoma Congress", PIGMENT CELL & MELANOMA RESEARCH, vol. 24, no. 5, 10 October 2011 (2011-10-10), pages 990-1075, XP055082293, ISSN: 1755-1471, DOI: 10.1111/J.1755-148X.2011.00909.x Abstract SMR-P91; page 1049

THOMAS METZNER ET AL: "Fibroblast Growth Factor Receptors as Therapeutic Targets in Human Melanoma: Synergism with BRAF Inhibition", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 131, no. 10, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 2087-2095, XP055141652, ISSN: 0022-202X, DOI: 10.1038/jid.2011.177 the whole document, in particular figures 1, 4 and 6

-
- (57) Предотвращение резистентности к ингибитору B-Raf для лечения пролиферативного заболевания путем получения образца опухоли у пациента и его тестирование на наличие генетических изменений в панели генов, включающей BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16, и применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который преодолевает резистентность к ингибитору B-Raf, причем второй ингибитор выбирают на основании обнаруженных генетических изменений в образце опухоли.

040191 B1

040191 B1

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к применению ингибитора B-Raf в комбинации со вторым ингибитором для лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в гене B-Raf, при этом второй ингибитор выбирается на основании генетических изменений, идентифицированных в образце опухоли.

Уровень техники

Были достигнуты значительные успехи в понимании молекулярных изменений, связанных с развитием меланомы. Онкогенные мутации B-RAF, серин-треониновой протеинкиназы RAF/MEK/ERK сигнального пути, в частности распространены при меланоме, от 40 до 60% меланом имеют активирующую мутацию в B-Raf гене. Замена глутаминовой кислоты на валин в 600 аминокислоте (V600E мутация) представляет более чем 95% описанных B-Raf мутаций. Эта мутация конститутивно активирует B-Raf и "даунстрим" сигнальную трансдукцию в RAF/MEK/ERK сигнальном пути, который проводит сигналы для пролиферации раковых клеток и выживания. В дополнение к меланоме, такие мутации B-Raf, как известно, происходят при других пролиферативных заболеваниях, например колоректальном раке, раке щитовидной железы, в частности папиллярном раке щитовидной железы, астроцитоммах, раке поджелудочной железы и нейрофиброматозах. Хотя значительные результаты, как известно, имеют место, когда такие заболевания лечат с помощью ингибитора B-Raf, развитие резистентности к терапии с ингибитором B-Raf типично, часто происходит в течение достаточно короткого периода времени.

Есть множество путей резистентности к лечению ингибитором B-Raf. Основные механизмы приводят к реактивации RAF/MEK/ERK сигнального пути в присутствии ингибитора B-Raf. Эта реактивация может происходить через повышенную активность рецепторных тирозинкиназ (RTK) через амплификацию гена и сверхэкспрессию и/или продуцирование лиганда, приобретение мутаций в генах NRAS и MEK1, обходной путь BRAF через сверхэкспрессию киназ, таких как COT и RAF-1 (CRAF), экспрессию сплайс-вариантов мутантного аллеля BRAF и повышенную экспрессию мутантного аллеля BRAF вследствие, например, амплификации гена. В дополнение, активация сигнальных путей выживания, которые отличаются от MAPK сигнального пути, таких как сигнальная система PI3K α , либо активация RTK, таких как PDGFR- β и IGF-1R, либо потеря гена PTEN также могут играть важную роль в резистентности. Другие механизмы, через c-MET и семейство FGFR RTK, являются потенциальными механизмами, которые могут способствовать резистентности к ингибиторам B-Raf при множественной меланоме.

Полученные данные, описанные выше, подчеркивают важность идентификации механизмов резистентности в режиме реального времени, с целью начать целесообразную комбинированную терапию на ранней стадии после рецидива при лечении ингибитором B-Raf. Использование подхода на основе механизма сопоставления генетических изменений, присутствующих в опухоли пациента во время рецидива по сравнению с предварительным лечением, должно быть возможным, чтобы идентифицировать вероятные механизмы резистентности. Это поможет в выборе соответствующей медикаментозной комбинированной терапии для конкретного пациента в целях эффективного избежания резистентности. Настоящее изобретение относится к подходу на основе механизма комбинированного лечения для расширения и улучшения терапевтических возможностей для пациентов с BRAF-мутантной прогрессирующей или метастазирующей меланомой, которая имеет очень плохой прогноз после развития резистентности к ингибиторам B-Raf.

Краткое описание

Настоящее изобретение относится к лечению пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, ингибитором B-Raf, где резистентность к ингибитору B-Raf снижается:

- (a) определением генетических изменений в образце опухоли, взятом у пациента,
- (b) применением комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, для пациента, причем второй ингибитор выбирают на основе генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 иллюстрирует эффект соединения формулы (I) и соединения F в качестве одиночных средств и в комбинации на рост модели клеточной линии HT-29 *in vivo*, как описано в примере 4.

Фиг. 2 иллюстрирует эффект соединения формулы (I) и соединения F в качестве одиночных средств и в комбинации на рост модели клеточной линии RKO *in vivo*, как описано в примере 4.

Фиг. 3 иллюстрирует эффект комбинирования ингибитора RAF (соединение формулы I) с ингибитором FGFR, соединение H, на пролиферацию двух, полученных из меланомы, клеточных линий, которые несут BRAFV600E-кодирующий аллель BRAF. Показан рост в реальном времени клеточных линий (вверху A) COLO 741 и (внизу B) SK-MEL-5, измеренный с помощью клеточного анализатора на основе полного сопротивления xCELLigence, как описано в примере 5. Где указанные FGF2 и соединение H были добавлены в культивационную среду в концентрации 100 нг/мл и 1 мкМ, соответственно. Соединение формулы (I) было использовано в концентрации 500 нМ в (A) и 100 нМ (B).

Фиг. 4 показывает эффект комбинирования соединения формулы (I) с ингибитором FGFR, соедине-

ние H, и лиганда FGFR, FGF2, на сигналинг двух мутантных по BRAFV600E, полученных из меланомы, клеточных линий *in vitro*. Показан вестерн-анализ обоих фосфорилированных и тотальных AKT, ERK1/2 и MEK1/2 протеинов, выделенных из (A) COLO 74 и (B) SK-MEL-5 клеток после обработки соединением формулы (I) (100 нМ), FGF2 (100 нг/мл) и соединением H (1 мкМ). Клетки обрабатывали в течение 2 и 24 ч средствами отдельно и в комбинации, как обсуждалось в примере 5.

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли от пациента и тестирование на генетические изменения в панели генов, включающей BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, где второй ингибитор выбран на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли.

В одном варианте реализации изобретения пролиферативное заболевание представляет собой рак. Термин "рак" используется в данном документе для обозначения широкого спектра опухолей, в том числе всех солидных опухолей и гематологических злокачественных новообразований. Примеры таких опухолей включают, но не ограничиваются этим, доброкачественные или злокачественные опухоли головного мозга, легких (в частности, мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого), плоскоклеточный рак, рак мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, головы и шеи, рак почек, почечных лоханок, мочеточника, яичников, предстательной железы, толстой кишки, пищевода, яичек, гинекологический рак (например, маточные саркомы, карцинома фаллопиевых труб, рак эндометрия, шейки матки, влагалища или вульвы), щитовидной железы, поджелудочной железы, костей, кожи, меланому, матки, яичников, прямой кишки, ануса, толстой кишки, яичек, болезнь Ходжкина, рак пищевода, тонкой кишки, эндокринной системы (например, щитовидной железы, паращитовидной железы или надпочечников), саркомы мягких тканей, рак уретры, полового члена, лейкемию, лимфомы, новообразования центральной нервной системы, саркомы, миеломы, рак желчных путей, печени, нейрофиброматоз, острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластические синдромы (МДС) и саркому Капоши.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения пролиферативное заболевание является меланомой, раком легких (включая немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)), колоректальным раком (КРР), раком молочной железы, раком почки, таким как, например, почечно-клеточный рак (ПКР), раком печени, раком эндометрия, острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), миелодиспластическим синдромом (МДС), раком щитовидной железы, в частности папиллярным раком щитовидной железы, раком поджелудочной железы, нейрофиброматозом или гепатоцеллюлярной карциномой.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения пролиферативное заболевание представляет собой солидную опухоль. Термин "солидная опухоль" означает, в особенности, меланому, рак молочной железы, рак яичников, рак толстой кишки и желудочно-кишечного тракта в целом, рак шейки матки, рак легкого (в том числе, мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого), рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы или саркому Капоши.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией V600 в B-Raf, например мутацией V600E. Пролиферативные заболевания, часто характеризующиеся такой мутацией, включают меланому, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, в частности папиллярный рак щитовидной железы, астроцитомы, рак поджелудочной железы и нейрофиброматоз. Настоящее изобретение, в особенности, относится к такому способу, в котором пролиферативная болезнь представляет собой меланому, характеризующуюся мутацией V600 в B-Raf, например V600E, V600K или V600G мутацией.

Ингибиторы B-Raf и их использование для лечения пролиферативных заболеваний известны в данной области техники. Вемурафениб (PLX4032) представляет собой ингибитор BRAF, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для лечения пациентов с меланомой, чьи опухоли экспрессируют BRAF V600E. Сорафениб и дабрафениб и CEP-32496 дополнительные известные ингибиторы B-Raf. Пиридиловые эфиры бензимидазола, описанные в патенте США № 7482367, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки, являются ингибиторами B-Raf, используемыми в данных комбинациях, в частности RAF265. Пиразоло-пиримидиновые производные, которые описаны в WO 2011/025927 и которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки, представляют собой другой класс ингибиторов B-Raf, пригодных для данных комбинаций.

Соответствующий второй ингибитор для комбинирования с ингибитором B-Raf выбран в соответствии с табл. 1 для лечения пациента на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли. Генетические изменения могут быть результатом амплификации гена, мутаций в гене или потери активности гена.

Таблица 1

Генетические изменения			Лекарство, которое предоставляется в комбинации с ингибитором B-Raf
Амплификация	Мутация	Потеря гена	
BRAF	MAP2K1		Ингибитор Mek1/2
CRAF	MAP2K2		
EGFR	NRAS		
	KRAS HRAS		
CCND1	CDK4	P16	Ингибитор CDK 4
HER2	PTEN	PTEN	Ингибитор киназы PI3
IGF-1R	PIK3CA		
CMET			Ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met
FGFR1			Ингибитор FGFR киназы
FGFR2			
FGFR3			
Или нет изменений в любом из вышеуказанных генов			Ингибитор Mek1/2

Информация, относящаяся к генам, идентифицированным в табл. 1, их последовательностям и ассоциированным протеинам, известна специалистам в данной области техники и встречается в общедоступных базах данных, например тех, которые предоставлены Национальным центром биотехнологической информации, Национальной библиотекой медицины США 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894USA, такие как GENE (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) или Управлением биологических и экологических исследований Научного отдела Министерства энергетики США, Информация о проекте Геном Человека (URL: <http://genomics.energy.gov/>).

Комбинированная медикаментозная терапия включает применение каждого из препаратов в комбинированной терапии в количестве, достаточном для обеспечения наблюдаемого улучшения по сравнению с исходными, клинически наблюдаемыми, симптомами и признаками заболевания, леченной комбинацией. Препараты могут предоставляться по отдельности (в порядке хронологического чередования, в особенности, строго последовательным образом) в таких временных интервалах, которые наиболее предпочтительны, таким образом, что у пациента проявляется (предпочтительно синергетическое) взаимодействие (совместный терапевтический эффект), в частности, когда резистентность к лечению ингибитором B-Raf у пациента преодолена или снижена.

Термин "фармацевтически эффективное количество" или "клинически эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" комбинации терапевтических средств представляет собой количество, достаточное для обеспечения наблюдаемого улучшения, по сравнению с исходными, клинически наблюдаемыми симптомами и признаками заболевания, леченной комбинацией.

Общие термины, используемые в данном документе, определяются следующими значениями, если явно не указано иное.

Термины "содержащий" и "включающий" используются в данном документе в их открытом для дополнения и неограничивающем смысле значения, если не указано иное.

Артикли и похожие ссылки в контексте описания изобретения (в особенности, в контексте нижеследующей формулы изобретения) следует истолковывать с целью охвата как единственного, так и множественного числа, если в данном документе не указано иное или явно противоречащее контексту. Если форма множественного числа используется для соединений, солей и т.п., это следует понимать также как одно соединение, соль и т.п.

Термин "комбинация", "терапевтическая комбинация", "комбинированная терапия" или "фармацевтическая комбинация", используемый в данном документе, определяет либо фиксированную комбинацию в одной единице дозы лекарственной формы или набор компонентов или инструкций для комбинированного введения, где ингибитор B-Raf и второй ингибитор могут быть введены независимо друг от друга в то же время или по отдельности в течение временных интервалов, которые позволяют партнерам по комбинации показывать кооперативный, например синергетический, эффект.

Термин "фармацевтическая композиция" определен в данном документе в отношении смеси или раствора, содержащего по меньшей мере один терапевтическое средство для введения субъекту, например млекопитающему или человеку, в целях предотвращения или лечения конкретного заболевания или

состояния, влияющего на млекопитающее.

Термин "фармацевтически приемлемый" определен в данном документе в отношении тех соединений, материалов, композиций и/или форм дозировки, которые в рамках обоснованного медицинского заключения подходят для контакта с тканями субъекта, например млекопитающего или человека, без чрезмерной токсичности, возбуждения аллергической реакции и других проблемных осложнений, соразмерных с разумным отношением польза/риск.

Термин "фармацевтически приемлемая соль", используемый в данном документе, если не указано иное, включает соли кислотных и основных групп, которые могут присутствовать в соединениях по настоящему изобретению. Соединения по настоящему изобретению, которые являются основными по природе, способны образовывать широкое разнообразие солей с различными неорганическими и органическими кислотами. Кислоты, которые могут быть использованы для приготовления фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей таких основных соединений по настоящему изобретению, являются такими, которые образуют нетоксичные кислотно-аддитивные соли, т.е. соли, содержащие фармацевтически приемлемые анионы, такие как ацетат, бензоат, бромид, хлорид, цитрат, фумарат, гидробромид, гидрохлорид, иодид, лактат, малеат, манделат, нитрат, оксалат, салицилат, сукцинат и тартратные соли. Если не указано иное, терапевтические средства, используемые в изобретенных способах, вводят в свободной форме или в форме фармацевтически соли.

Термин "комбинированный препарат" определен в данном документе в отношении, в особенности, "набора компонентов" в том смысле, что партнеры по комбинации (a) и (b), как определено выше, могут дозироваться независимо или путем использования различных фиксированных комбинаций с различными количествами партнеров по комбинации (a) и (b), т.е. одновременно или в разные моменты времени. Компоненты из набора компонентов затем могут, например, быть введены одновременно или в порядке хронологического чередования, т.е. в разные моменты времени и с одинаковыми или различными временными интервалами для любого компонента из набора компонентов. Соотношение совокупных количеств партнера по комбинации (a) к партнеру по комбинации (b) для введения в составе комбинированного препарата может варьировать, например, для того, чтобы справляться с потребностями субпопуляции пациентов, которые будут подвергаться лечению, или потребностями одного пациента.

Термин "совместное введение", "комбинированная терапия" или "комбинированное введение", используемые в данном документе, охватывают в своем значении введение выбранных терапевтических средств одному пациенту и подразумевают схемы лечения, при которых средства необязательно вводят одним и тем же способом введения или в то же самое время.

Термин "лечащий" или "лечение", используемые в данном документе, включают облегчение лечения, уменьшение или смягчение по меньшей мере одного симптома у субъекта или осуществления замедления прогрессирования заболевания.

Например, лечение может привести к уменьшению одного или нескольких симптомов заболевания или полному излечиванию заболевания, такого как рак. В контексте настоящего изобретения, термин "лечить" также означает задержку, отсрочивание наступления (т.е. периода, предшествующего клиническому проявлению заболевания) и/или снижение риска развития или обострения заболевания. Термин "защита" используется в данном документе для обозначения предотвращения, задержки или лечения, или, в соответствующих случаях, всего вместе, развития или продолжительности или обострения заболевания у субъекта.

Термин "субъект" или "пациент", используемые в данном документе, относится, в частности, к человеку, например человеку, страдающему, находящемуся в группе риска или потенциально способному пострадать от пролиферативного заболевания. Тем не менее, не исключено применение для лечения млекопитающих, например собак, коров, лошадей, свиней, овец, коз, кошек, мышей, кроликов, крыс и трансгенных, отличных от человека, животных.

Термин "примерно" или "приблизительно" должен иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5%, от данной величины или диапазона.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента и тестирование на наличие генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, где второй ингибитор выбирают на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли в соответствии с табл. 1, в частности, в которой:

(i) второй ингибитор представляет собой ингибитор Mek 1/2, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR, или

(ii) второй ингибитор представляет собой ингибитор CDK 4, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в CCND1, CDK4 или P16, или

(iii) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы PI3, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в HER2, IGF-1R, PTEN или PIK3CA, или

(iv) второй ингибитор представляет собой ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в cMET,

(v) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы FGFR, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в FGFR1, FGFR2 или FGFR3.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента и обнаружение генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии по отношению к пациенту, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор Mek 1/2.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента и обнаружение генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя CCND1, CDK4 или P16;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии по отношению к пациенту, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор CDK 4.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента после прогрессирования заболевания и обнаружение генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя HER2, IGF-1R, PTEN или PIK3CA;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии по отношению к пациенту, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор PI3 киназы.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента и обнаружение генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя cMET;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии по отношению к пациенту, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли у пациента и обнаружение генетического изменения в гене, выбранном из группы, включающей в себя FGFR1, FGFR2 или FGFR3;

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии по отношению к пациенту, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор киназы FGFR.

В существенном варианте реализации настоящего изобретения предварительно пациент подвергался лечению с применением монотерапии с ингибитором B-Raf. В частности, пациент подвергается лечению с применением монотерапии с ингибитором B-Raf с последующей, установленной в соответствии с табл. 1, комбинированной медикаментозной терапией, до момента прогрессирования заболевания.

В предпочтительном варианте реализации ингибитор B-Raf непрерывно вводят в виде монотерапии до момента прогрессирования заболевания или до начала комбинированной медикаментозной терапии, и непрерывное введение продлевается в течение лечения с применением комбинированной медикаментозной терапии.

В другом варианте реализации изобретения ингибитор B-Raf вводят в виде прерывистой схемы дозирования, что означает, что ингибитор B-Raf вводят в течение периода времени, за которым следует период времени, в котором лечение ингибитором B-Raf приостанавливается. Например, ингибитор Raf вводят ежедневно в течение периода 3 или 4 недель с последующим периодом в 1 или 2 недели без лечения, и цикл повторяется.

Прогрессирование заболевания оценивается с помощью соответствующих клинических критериев, таких как критерии RECIST. RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (критерии оценки ответа при солидных опухолях)) представляет собой набор опубликованных правил, позволяющих определить, когда состояние больного раком улучшилось ("ответ"), осталось на прежнем уровне ("стабильный") или ухудшилось ("прогрессия") во время лечения. Оригинальные критерии были опубликованы в февра-

ле 2000 года в рамках международного сотрудничества, включая Европейскую Организацию по Исследованию и Лечению Рака (ЕОИЛР), Национальный Института Рака (НИР) США и Национальный Институт Раковых Заболеваний Группы Клинических Испытаний Канады. RECIST 1.1, опубликование в январе 2009 года, обновлены до оригинальных критериев. См. Eur. J. Cancer, 45, (2009) 228-247.

Механизм прогрессирования заболевания определяется путем сопоставления генетических изменений, присутствующих в опухоли пациента во время рецидива, например, по сравнению с предварительным лечением. Генетические изменения могут быть результатом амплификации гена, мутаций в гене или потери активности гена. Генетические изменения определяются способами, известными в данной области техники, как правило, известными способами секвенирования. В предпочтительном варианте реализации сравниваются гены, выбранные из группы, состоящей из B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16 в образцах опухолей, взятых во время рецидива по сравнению с предварительным лечением.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к тестированию образца опухоли, взятого у пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, на предмет генетических изменений в панели генов, включающей в себя B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16 в целях определения механизма прогрессирования заболевания после лечения ингибитором B-Raf.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики с целью выбора второго ингибитора для последующего комбинирования с ингибитором B-Raf, в котором образец опухоли тестируется на наличие генетических изменений одного из нескольких генов, выбранных из B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16. Второй ингибитор выбирают в соответствии с табл. 1. Предпочтительно второй ингибитор выбирают таким образом, чтобы преодолеть резистентность к лечению ингибитором B-Raf.

Настоящее изобретение также относится к геному чипу, используемому для обнаружения генетических изменений в одном из нескольких генов, выбранных из B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16, или который включает все или несколько из вышеупомянутых генов. Генный чип используется для определения механизма резистентности к лечению ингибитором B-Raf и для выбора второго ингибитора, который будет использован в комбинированной медикаментозной терапии, которая преодолет эту резистентность.

Конкретный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой способ лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) введение терапевтически эффективного количества ингибитора B-Raf пациенту до момента, пока не проявится прогрессирование заболевания,

(b) получение образца опухоли у пациента после прогрессирования заболевания и тестирование на наличие генетического изменения в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16, и

(c) применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, где второй ингибитор выбран на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли, в котором:

(i) второй ингибитор представляет собой ингибитор Mek 1/2, в том случае, если генетическое изменение в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR, или

(ii) второй ингибитор представляет собой ингибитор CDK 4, в том случае, если генетическое изменение в CCND1, CDK4 или P16, или

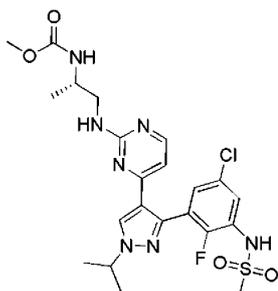
(iii) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы

P13, в том случае, если генетическое изменение в HER2, IGF-1R, PTEN или PIK3CA, или

(iv) второй ингибитор представляет собой ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met, в том случае, если генетическое изменение в cMET, или

(v) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы FGFR, в том случае, если генетическое изменение в FGFR1, FGFR2 или FGFR3.

Предпочтительный ингибитор B-Raf, используемый в настоящем изобретении, представляет собой соединение формулы (I):



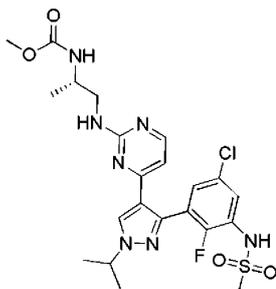
(I).

Соединение формулы (I) и его применение в качестве ингибитора B-Raf раскрыты в WO 2011/025927.

Таким образом, настоящее изобретение, в частности, относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) получение образца опухоли от пациента и тестирование на наличие генетического изменения в одном или нескольких генах, выбранных из группы, состоящей из BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16, и

(b) применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль и второй ингибитор, где второй ингибитор выбирают на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли в соответствии с табл. 1, в частности, в которой:

(i) второй ингибитор представляет собой ингибитор Mek 1/2, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR или, когда никаких генетических изменений не было обнаружено на стадии (b), или

(ii) второй ингибитор представляет собой ингибитор CDK 4, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в CCND1, CDK4 или P16, или

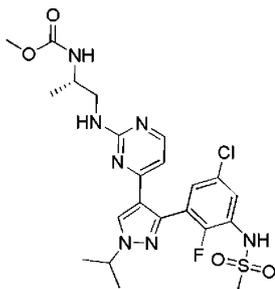
(iii) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы PI3, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в HER2, IGF-1R, PTEN или PIK3CA, или

(iv) второй ингибитор представляет собой ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в cMET, или

(v) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы FGFR, в том случае, если образец опухоли имеет генетическое изменение в FGFR1, FGFR2 или FGFR3.

Более конкретный вариант реализации настоящего изобретения включает проведение монотерапии с использованием ингибитора B-Raf Формулы (I) до начала комбинированной медикаментозной терапии. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в частности V600 мутацией в B-Raf, более конкретно меланомой, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает:

(a) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора B-Raf формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемой соли, пока у пациента не проявляется прогрессирование заболевания,

(b) получение образца опухоли у пациента после прогрессирования заболевания и тестирование на наличие генетического изменения в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, HRAS, PTEN, PIK3CA и P16,

(c) применение комбинированной медикаментозной терапии, включающей ингибитор B-Raf и второй ингибитор, где второй ингибитор выбирают на основании генетических изменений, обнаруженных в образце опухоли в соответствии с табл. 1, в частности, в которой:

(i) второй ингибитор представляет собой ингибитор Mek 1/2, в том случае, если механизм прогрессирования заболевания характеризуется генетическим изменением в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR или, когда никаких генетических изменений не было обнаружено на стадии (b), или

(ii) второй ингибитор представляет собой ингибитор CDK 4, в том случае, если механизм прогрессирования заболевания характеризуется генетическим изменением в CCND1, CDK4 или P16, или

(iii) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы PI3, в том случае, если механизм прогрессирования заболевания характеризуется генетическим изменением в HER2, IGF-1R, PTEN или PIK3CA, или

(iv) второй ингибитор представляет собой ингибитор рецепторной тирозинкиназы c-Met в том случае, если механизм прогрессирования заболевания характеризуется генетическим изменением в cMET, или

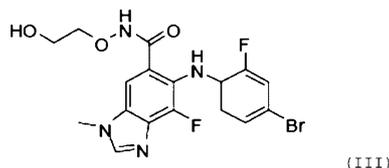
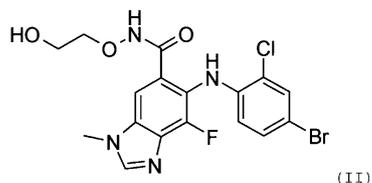
(v) второй ингибитор представляет собой ингибитор киназы FGFR, в том случае, если механизм прогрессирования заболевания характеризуется генетическим изменением в FGFR1, FGFR2 или FGFR3.

Соединение формулы (I) может вводиться непрерывно или прерывистой схемой дозирования на этапах (a) и (c). Предпочтительным является непрерывное введение.

В каждом из указанных выше способов предпочтительные варианты реализации изобретения, в особенности, включают такие, в которых пролиферативное заболевание характеризуется мутацией V600 в B-Raf, например мутацией V600E. Пролиферативные заболевания, часто характеризующиеся такой мутацией, включают меланому, колоректальный рак, рак щитовидной железы, в частности папиллярный рак щитовидной железы, астроцитомы, рак поджелудочной железы и нейрофиброматоз. Предпочтительно пролиферативное заболевание представляет собой меланому или колоректальный рак, характеризующийся мутацией V600 в B-Raf, например V600E, V600G или V600K мутацией. Настоящее изобретение, в особенности, относится к такому способу, в котором пролиферативное заболевание представляет собой меланому, характеризующуюся мутацией V600 в B-Raf, например V600E, V600K или V600G мутацией.

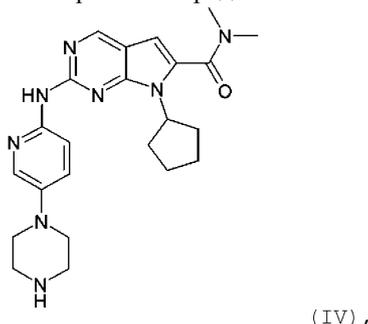
Соответствующие ингибиторы Mek 1/2 для использования в составе настоящего способа известны в данной области техники. Ингибиторы Mek 1/2, используемые в настоящем изобретении, включают PD325901, PD-181461, ARRY142886 / AZD6244, ARRY-509, XL518, JTP-74057, AS-701255, AS-701173, AZD8330, ARRY162, ARRY300, RDEA436, E6201, RO4987655/R-7167, GSK1120212 или AS703026.

В важном варианте реализации изобретения ингибиторы Мек 1/2 включают соединения, описанные в WO03/077914, включенном в данный документ в полном объеме посредством ссылки, в частности соединение формулы (II) или (III):



или их фармацевтически приемлемые соли (далее называемые соединениями А и В соответственно) и соединения, описанные в WO05/051906, WO05/023251, WO03/077855, US20050049419 и US7235537, включенные в данный документ в полном объеме посредством ссылки, охватывающие N3-алкилированные бензимидазолы и другие подобные гетероциклические производные, такие как ингибиторы Мек 1/2, для лечения пролиферативных заболеваний.

Ингибиторы CDK 4 известны в данной области техники и включают в себя флавопиридол, P1446A-05, LEE011, AT7519, BMS265246, LY2835219 и PD-0332991. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения ингибитор CDK 4 представляет собой соединение, описанное в WO2007/140222 или WO 20210/020675, включенных в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В конкретном варианте реализации изобретения ингибитор CDK 4 представляет собой соединение формулы (IV):

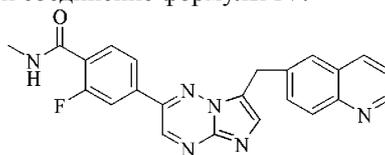


или его фармацевтически приемлемую соль, далее называемое как соединение С.

Ингибиторы PI3 киназы известны в данной области техники и включают перифозин, CAL-101, PX-866, BEZ235, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, XL765, Palomid529, GSK1059615, Zstk474, PTW33597, IC87114, TG100-115, CAL283, PI-103, BYL719, GNE-477, CUDC-907 и AEZS-136.

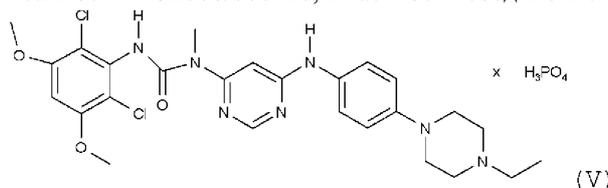
WO2006/122806, включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки, описывает производные имидазохинолина, владеющие ингибирующей активностью по отношению к PI3-киназе. Очень предпочтительным соединением по настоящему изобретению является 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидро-имидазо[4,5-с]хинолин-1-ил)-фенил]-пропионитрил и его монотосилатная соль (соединение D). Синтез 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидро-имидазо [4,5-с]хинолин-1-ил)-фенил]-пропионитрила, например, является описанным в WO2006/122806, как примеры 7 и 152-3. Еще одним очень предпочтительным соединением по настоящему изобретению является 8-(6-метокси-пиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметил-фенил)-1,3-дигидро-имидазо [4,5-с]хинолин-2-он (соединение E). Синтез 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-2-она, например, является описанным в WO2006/122806, как пример 86. WO07/084786 описывает производные пиридина, владеющие ингибирующей активностью по отношению к PI3-киназе. Очень предпочтительным соединением по настоящему изобретению является 5-(2,6-диморфолин-4-ил-пиридин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламин (соединение F). Синтез 5-(2,6-диморфолин-4-ил-пиридин-4-ил)-4-трифторметилпиридин-2-иламина описан в WO07/084786 как пример 10. Другим предпочтительным соединением, владеющим ингибирующей активностью по отношению к PI3-киназе, является (S)-пирролидин-1,2-дикарбоновой кислоты 2-амид 1-({4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)-пиридин-4-ил]-тиазол-2-ил}-амид) (соединение X).

Ингибиторы рецепторной тирозинкиназы с-Met известны в данной области техники и включают в себя кризотиниб, PHA-665752, SU11274, PF-04217903, форетиниб, SGX523, JNJ-38877605, GSK1363089, AMG208 и INCB28060. В конкретном варианте реализации изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы с-Met представляет собой соединение формулы IV:



или его фармацевтически приемлемую соль (далее соединение G).

Ингибиторы киназы FGFR, используемые согласно данному способу, представляют собой предпочтительно селективный и АТФ конкурентный пан ингибитор киназы FGFR, включая AZD4547 и BGJ398. В конкретном варианте реализации ингибитор киназы FGFR представляет собой арил-пиримидил-производное мочевины, описанное в WO2006/000420, в частности соединение формулы (V):



или его фармацевтически приемлемую соль (далее соединение H).

Особое предпочтение отдается вариантам реализации изобретенных способов, в которых ингибитором MEK 1/2 является соединение А или соединение В, в особенности, соединение В, ингибитором CDK 4 является соединение С, ингибитором PI3-киназы является соединение D, соединение E, соединение F или соединение X, в особенности, соединение F, ингибитором рецепторной тирозинкиназы с-Met является соединение G, и в которых ингибитором киназы FGFR является соединение H или его фармацевтически приемлемая соль вышеупомянутых соединений.

Ингибитор B-Raf формулы (I) вводят в дозе от 150 до 600 в день, предпочтительно от 400 до 600 в день, в частности 450 или 600 мг/день. В качестве второго ингибитора комбинированной медикаментозной терапии соединение В вводят в дозе от 15 до 60 мг два раза в сутки, предпочтительно 45 мг два раза в сутки, соединение С вводят в дозе от 100 до 900 мг/день, предпочтительно от 200 до 900 мг/день, например 200, 400, 700 или 900 мг/день, соединение F вводят в дозе от 30 до 100 мг/день, предпочтительно от 60 до 100 мг/день или от 60 до 80 мг/день, соединение G вводят в дозе от 50 до 300 мг два раза в сутки, предпочтительно от 100 до 300 мг два раза в сутки, например 100, 150, 200, 250 или 300 мг два раза в сутки или соединение H вводят в дозе от 25 до 125 мг/день, например 75, 100 или 125 мг/день.

Существенным вариантом реализации вышеупомянутых способов является генетическое изменение в BRAF, обнаруженное в образце опухоли, которое представляет собой отличное от V600 мутации.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим комбинациям, включающим ингибитор B-Raf, предпочтительно ингибитор B-Raf формулы (I) и второй ингибитор, выбранный из группы, состоящей из ингибитора PI3-киназы, ингибитора рецепторной тирозинкиназы с-Met и ингибитора киназы FGFR для раздельного, одновременного или последовательного введения. Более конкретно, терапевтическая комбинация включает ингибитор B-Raf формулы (I) и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор киназы PI3, выбранный из группы, состоящей из соединения D, соединения E, соединения F и соединения X или фармацевтически приемлемой соли этих соединений; или терапевтической комбинации, включающей ингибитор B-Raf формулы (I) и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор с-Met, выбранный из соединения G или его фармацевтически приемлемой соли; или терапевтической комбинации, включающей ингибитор B-Raf формулы (I) и второй ингибитор, который представляет собой ингибитор киназы FGFR, выбранный из соединения H или его фармацевтически приемлемой соли, для раздельного, одновременного или последовательного введения. Далее такие терапевтические комбинации упоминаются как комбинация по изобретению.

Дополнительно, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, например от меланомы, характеризующейся V600 мутацией в B-Raf, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации, включающей ингибитор B-Raf, предпочтительно ингибитор B-Raf Формулы (I) и второй ингибитор, выбранный из группы, состоящей из ингибитора киназы PI3, ингибитора рецепторной тирозинкиназы с-Met и ингибитора киназы FGFR. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, такой как мутация V600, например от меланомы, характеризующейся наличием мутации V600 в B-Raf, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации по изобретению.

Предпочтительно эти ингибиторы вводятся в терапевтически эффективных дозах, которые при

смешивании обеспечивают положительный эффект. Введение может быть отдельным, одновременным или последовательным.

Также настоящее изобретение имеет отношение к комбинации по изобретению для использования при получении фармацевтической композиции или лекарственного средства для лечения или профилактики пролиферативного заболевания, характеризующегося мутацией в B-Raf, в особенности, V600 мутацией в B-Raf, например меланомы, характеризующейся V600 мутацией в B-Raf, у пациента, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает коммерческую фасовку, включающую в качестве терапевтических средств комбинацию по изобретению, вместе с инструкциями для одновременного, отдельного или последовательного их введения для использования в замедлении прогрессирования или лечения пролиферативного заболевания.

Введение комбинации по изобретению может привести не только к положительному эффекту, например синергетическому терапевтическому эффекту, например, в отношении облегчения, замедления прогрессирования или подавления симптомов, но и к дальнейшим удивительным положительным эффектам, например уменьшению побочных эффектов, более долговременному ответу, улучшению качества жизни или уменьшению заболеваемости, по сравнению с монотерапией, использующей только один из фармацевтически терапевтических средств, используемых в комбинации по изобретению.

Нижеследующие примеры предназначены для иллюстрации, но не ограничения, изобретения.

Пример 1.

В течение первой части исследования, пациентов лечат с помощью ингибитора B-Raf формулы (I) в качестве монотерапии в рекомендованной фазой II дозе 450 мг/день. Ингибитор B-Raf формулы (I) вводят перорально в виде инкапсулированной твердой дисперсии.

Во второй части исследования, пациентов будут лечить ингибитором B-Raf формулы (I) в комбинации со вторым средством направленного действия (т.е. ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение В, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение F, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение H, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение G или ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение С). Увеличение дозы в составе каждой из комбинаций будет контролироваться согласно модели Байесовской логистической регрессии (БМЛР) в целях установления соотношения максимально переносимой дозы/рекомендованной для проведения II фазы терапевтической дозы (МПД/Р2ФД) для каждой из комбинаций, если это не было ранее определено в ходе отдельного испытания комбинации. Дизайн расширенных испытаний с использованием немаскированной дозы проводят с использованием БМЛР, который представляет собой официально утвержденный метод для оценки МПД и/или Р2ФД у больных раком. Адаптивная БМЛР будет ориентирована на принцип контроля передозировки при увеличении дозы (КПУД) для контроля риска дозозимитирующей токсичности (ДЛТ) у будущих пациентов при исследовании. Увеличение индивидуальной дозы для пациента будет разрешено после первого цикла для тех пациентов, которые не испытали ДЛТ.

Увеличение индивидуальной дозы для пациента будет контролироваться при помощи БМЛР с модифицированным КПУД критерием, который отражает индивидуальную переносимость у пациента. Использование Байесовских адаптивных моделей ответа на лечение для малых наборов данных было принято Европейским агентством лекарственных средств (ЕАЛС) и их развитие и соответствующее использование представляет собой один из аспектов инициативы критического пути управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

Обоснование необходимости выбора комбинированных препаратов.

Данные доклинических и клинических исследований показывают, что одновременное, двойное, вертикально направленное ингибирование RAF/MEK/ERK сигнального пути при помощи комбинации ингибитора B-Raf формулы (I) и соединения В может вести к увеличению клинической эффективности и, возможно, преодолению ранней резистентности к одиночному средству у пациентов с BRAF V600-зависимой прогрессирующей меланомой. Кроме того, другие механизмы, которые реактивируют MAPK сигналинг или активируют альтернативные пути, такие как PI3K/AKT сигнальный путь, могут играть роль в первичной и/или приобретенной резистентности к ингибиторам BRAF. Таким образом, противоопухолевая активность ингибитора B-Raf формулы (I) в комбинации с выбранным средством соединения F, соединения H, соединения G и соединения С, которые направлены на киназы PI3K, c-met, FGFR и CDK4/6, соответственно, будет также оцениваться в дополнение к ингибитору B-Raf формулы (I)+соединение В. Выбор комбинации ингибитора B-Raf формулы (I), даваемого индивидуальному пациенту, будет основываться на генетическом(их) изменении(ях), обнаруженных в образце опухоли этого пациента при прогрессировании заболевания при лечении ингибитором B-Raf формулы (I) (см. табл. 1).

Описание сущности дизайна исследования.

Это многоцентровое, немаскированное исследование фазы II, в котором примут участие около 100 пациентов с мутантной по BRAF локально прогрессирующей или метастатической меланомой, и состоящее из двух частей.

В первой части, части I, пациенты, "наивные" по отношению к селективному ингибитору BRAF, будут подвергаться лечению с ингибитором B-Raf формулы (I), в качестве одиночного средства при Р2ФД 450 мг/день, пока заболевание не прогрессирует (как определено в RECIST ч. 1.1). Во время про-

грессирования заболевания, опухоль будет биопсирована и проанализирована по выбранной панели генов (табл. 1).

Пациенты, рецидивирующие в части I исследования, будут продолжать получать ингибитор B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, в течение срока выполнения молекулярного анализа биопсии из резистентной опухоли, до тех пор, пока соответствующая рациональная комбинация ингибитора B-Raf формулы (I) будет определена и применена.

На основании генетических изменений, выявленных в биопсии опухоли при рецидиве, группы пациентов войдут во вторую часть исследования, часть II, для проведения специализированного комбинированного лечения ингибитором B-Raf формулы (I) плюс второе средство направленного действия. Там будет 5 направлений, соответствующих 5 вариантам исследуемого комбинированного лечения: ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение В, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение F, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение H, ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение G и ингибитор B-Raf формулы (I)+соединение С. Выбор второго средства будет определен по следующей таблице критериев - табл. 1. Ожидается, что более чем половина включенных в исследование пациентов получит комбинированное лечение ингибитором B-Raf формулы (I) плюс соединение В после успехов в лечении ингибитором B-Raf формулы (I).

Не "наивные" пациенты по отношению к лечению ингибитором BRAF, у которых отмечался рецидив в предыдущем исследовании, в котором пациенты с меланомой, мутантной по BRAF V600, подвергались лечению ингибитором B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, после наступления прогрессирования заболевания, могут подвергаться лечению в части II. Для этих пациентов результаты анализа свежей биопсии опухоли, собранной при посещении в конце лечения по предыдущему испытанию, будут использоваться для комбинированного лечения в Части II.

Пациенты с рецидивом, участвующие в других исследованиях ингибитора B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства (например, ПТ), не будут проходить лечение с ингибитором B-Raf формулы (I) после прогрессирования заболевания и перестанут принимать ингибитор B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, до тех пор, пока они не будут допущены к целесообразной комбинированной терапии в части II исследования.

Прогрессирующее заболевание у этих пациентов считается подтвержденным исходя из предыдущих исследований и будет использовано в качестве базовой линии для оценки опухоли для части II исследования, если временной интервал перед клиническим испытанием (КИ) на момент прогрессирования заболевания и началом экспериментального лечения в пределах этого исследования не превышает 28 дней.

Все пациенты начнут получать целесообразную комбинацию исходя из определенной двойной комбинации МПД/Р2ФД или, если двойная комбинация МПД/Р2ФД ранее не была определена, в виде Р2ФД 450 мг/день для ингибитора B-Raf формулы (I) (или в виде наивысшей дозы, переносимой пациентом) в комбинации со вторым средством в начальной дозированной дозе по модели Байесовской логистической регрессии. Целесообразная часть комбинированного лечения будет продолжаться с возможностью возрастания дозы второго средства до момента, пока МПД/Р2ФД для комбинации не будет установлена. Увеличение индивидуальной дозы второго средства для пациента, контролируемой БМЛР, будет разрешено в предопределенных условиях для тех пациентов, у которых развилась толерантность к комбинации в назначенной дозе в течение по меньшей мере одного цикла.

Комбинированное лечение будет проводиться до тех пор, пока заболевание прогрессирует, в виде 21-дневных циклов, показатели опухоли во время комбинированного лечения будут сравниваться с пересчитанной базовой линией (т.е. результат оценки опухоли приводит к оценке прогрессирования заболевания (ПЗ) при лечении ингибитором B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства или в части I или в предыдущем исследовании).

Предварительный молекулярный скрининг.

Для начала скрининговой фазы исследования, пациенты должны иметь письменную документацию мутации BRAF V600, которая должна быть получена на месте на свежей биопсии опухоли (предпочтительно) или на самом последнем архивном материале образца опухоли. Тем не менее, пациенты, для которых молекулярный статус не известен на момент рассмотрения для зачисления в данное исследование, и те, кто имеет опухоль, которая не подвергалась стандартной процедуре скрининга на наличие мутации BRAF в местной лаборатории, и для кого требуется взятие свежего образца опухоли, будут подписывать Информированное Согласие для предварительного молекулярного скрининга, позволяющее производство забора свежего образца опухоли для оценки мутационного статуса на месте проведения испытаний. Как только мутационный статус гена BRAF V600 становится известен или определен, пациент имеет право подписать основную часть формы информированного согласия исследования и начать скрининг.

Скрининг.

Как только мутационный статус гена BRAF V600 становится известен или определен, пациент имеет право подписать основную часть формы информированного согласия исследования и начать скрининг. Все скрининговые измерения должны быть выполнены до назначения экспериментального лечения.

Период лечения.

Предполагаются две части проведения лечения: часть I и часть II.

Часть I - это фаза проведения лечения одиночным средством и начнется в день 1 цикла 1 до начала проведения комбинированного лечения.

Часть II - это комбинированное лечение, должно быть начато сразу, как только генетические изменения из биопсии опухоли, взятой при рецидиве, станут известны.

Процедуры экспериментального лечения, с целью изучения, будут проводиться в течение 21-дневных циклов и будут продолжаться до момента прогрессирования заболевания (при проведении комбинированного лечения, состоящего из двух частей), непереносимой токсичности, отзыва информированного согласия или смерти.

Популяция пациентов.

Исследование будет проводиться на взрослых пациентах с локально прогрессирующей или метастатической меланомой, несущей подтвержденную мутацию BRAF V600.

Пациенты, зачисленные в первую часть испытания (часть I), должны быть "наивными" по отношению к селективному ингибитору BRAF.

Пациенты, ранее подвергавшиеся лечению ингибитором B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, могут быть непосредственно включены в часть II, если биопсия опухоли взята во время рецидива.

Пациенты, зачисленные в это исследование, не допускаются к участию в параллельных исследованиях по изучению препаратов или устройств. Кроме того, пациенты, завершившие исследование, не должны быть повторно включены во второй курс лечения.

Исследователь, или назначенное им лицо, должен убедиться, что только тем пациентам, которые удовлетворяют все нижеследующие требования и не имеют критериев исключения, предлагается лечение в исследовании.

Критерии включения.

Пациенты, ранее не принимавшие ингибитор B-Raf формулы (I) (могут быть включены в часть I).

Пациенты, имеющие право на включение в исследование, должны соответствовать всем следующим критериям.

Возраст ≥ 18 лет на момент начала дозирования препарата.

Возможность понять и добровольно подписать форму информированного согласия и способность соблюдать график посещения исследования и другие требования протокола. Подписанное информированное согласие должно быть получено до проведения процедур скрининга.

Гистологически подтвержденный диагноз неоперабельной III стадии или метастатической меланомы (стадия от IIIС до IV согласно Американскому объединенному комитету рака (АОКР)).

Письменная документация о BRAF V600 мутации.

Свежая биопсия опухоли на уровне базовой линии и соглашение пациента на обязательное взятие биопсии при рецидиве, если нет медицинских противопоказаний.

Свидетельство определяемого заболевания, как установлено RECIST ч. 1.1.

Примечание: очаги повреждения в области проведения предварительной лучевой терапии или локорегионарной терапии (например, чрескожная абляция) не следует рассматривать в качестве определяемых до момента, пока прогрессирование поражения не было задокументировано после начала терапии.

Средняя продолжительность жизни ≥ 3 месяцев.

Общесоматический статус согласно шкале Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ≤ 2 .

Отрицательный сывороточный тест на беременность в течение 72 ч до первой дозы экспериментального лечения у всех женщин детородного возраста.

Обязательная свежая биопсия при рецидиве после лечения ингибитором B-Raf формулы (I) в качестве одиночного вещества должна быть доступна.

Пациенты, участвующие в других исследованиях ингибитора B-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, с задокументированным прогрессирующим заболеванием, могут присоединиться к части II по результатам профиля резистентности, которые будут определять назначение комбинированной терапии для лечения.

Прогрессирующее заболевание этих пациентов должно быть подтверждено исходя из предыдущих исследований при помощи показателей оценки опухоли. Если интервал времени между оценкой опухоли при документировании прогрессирования заболевания и первой дозой комбинированного лечения составляет более 4 недель (28 дней), должна быть проведена новая оценка опухоли. Биопсия, выполненная в конце посещения курса лечения предыдущего исследования и охарактеризованная посредством всеобъемлющего геномного анализа, будет необходима для назначения комбинированного лечения.

Критерии исключения.

Пациенты, имеющие право на участие в этом исследовании, не должны соответствовать какому-либо из следующих критериев.

Участие в части I (лечение ингибитором ингибитором B-Raf формулы (I) в качестве одиночного

вещества):

предыдущее лечение с использованием RAF-ингибитора, симптоматическое или нелеченное лептоменингеальное заболевание, симптоматические метастазы в головной мозг. Пациенты, ранее подвергающиеся лечению или нелеченные, исходя из наличия этих состояний, которые являются бессимптомными при отсутствии терапии кортикостероидами, имеют право участвовать. Метастазы в головной мозг должны находиться в стабильном состоянии по меньшей мере три месяца, с проверкой при помощи визуализации (например, МРТ головного мозга или КТ, завершённые до скрининга и демонстрирующие отсутствие текущих доказательств прогрессирующих метастаз в головной мозг). Пациенты не допускаются к получению индуцирующих ферментативную активность противоэпилептических препаратов.

Известный острый или хронический панкреатит.

Клинически значимое сердечное заболевание, в том числе любое из нижеследующих:

хроническая сердечная недостаточность (ХСН), требующая лечения (по шкале классификации, предложенной Нью-Йоркской ассоциацией сердца, класс ≥ 2), фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) $< 45\%$, определенная при помощи радионуклидной равновесной вентрикулографии (РРВ) или эхокардиограммы, или неконтролируемая артериальная гипертензия (см. рекомендации по лечению гипертензии ВОЗ-МОГ),

история болезни или наличие клинически значимых аритмий желудочка или фибрилляции предсердий,

клинически значимая брадикардия в состоянии покоя,

нестабильная стенокардия в течение ≤ 3 месяцев до начала исследования препарата,

острый инфаркт миокарда (ОИМ) в течение ≤ 3 месяца до начала исследования препарата,

величина интервала QTcF (коррекция Fridericia) > 480 мс при проведении ЭКГ.

Пациенты с любым из нижеследующих лабораторных показателей на базовой линии:

абсолютное количество нейтрофилов (АКН) $< 1,500/\text{мм}^3$ [$1,5 \times 10^9/\text{л}$],

тромбоциты $< 100,000/\text{мм}^3$ [$100 \times 10^9/\text{л}$],

гемоглобин $< 9,0$ г/дл,

сывороточный креатинин $> 1,5 \times \text{ВГН}$,

сывороточный билирубин $> 1,5 \times \text{ВГН}$,

АсАТ/SGOT и АлАТ/SGPT $> 2,5 \times$ верхней границы нормы (ВГН) или $> 5 \times \text{ВГН}$, если присутствуют метастазы в печени,

нарушение функции желудочно-кишечного (GI) тракта или заболевания GI, которые могут существенно изменить всасывание перорального интервенционного препарата (например, язвенные заболевания, неконтролируемая тошнота, рвота, диарея, синдром мальабсорбции, резекции тонкой кишки).

Предшествующее или сопутствующее злокачественное заболевание. Исключения: адекватное лечение базального рака кожи или плоскоклеточного рака кожи; in situ карцинома шейки матки, радикально леченная и без доказательств рецидива в течение по крайней мере 3-х лет до момента включения в исследование; или другая, радикально леченная, солидная опухоль и без доказательств рецидива в течение по меньшей мере 3-х лет до момента включения в исследование.

История тромбозов или цереброваскулярных происшествий в течение последних 6 месяцев, в том числе транзиторная ишемическая атака, инсульт, тромбоз глубоких вен или легочная эмболия.

Пациенты, получавшие лучевую терапию (что включает в себя $> 30\%$ резерва костного мозга), химиотерапию, биологическую терапию (например, антитела) в течение ≤ 4 недель (6 недель для нитрозомочевины, митомицина-С) или которые подвергались постоянному или периодическому лечению с использованием низкомолекулярных терапевтических или исследуемых средств в течение 5 периодов полужизни средства (или ≤ 4 недели, когда период полужизни неизвестен) до начала исследования препарата, или которые не оправились от побочных эффектов такого лечения (за исключением алопеции).

Пациенты, которые прошли любую серьезную операцию в течение последних 2 недель до начала исследования препарата или которые не полностью оправились от предыдущей операции.

Известное инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Другое тяжелое, острое или хроническое медицинское или психическое состояние или лабораторные аномалии, которые могут увеличить риск, связанный с участием в исследовании, или введение исследуемого препарата или то, что может помешать интерпретации результатов исследования и, по мнению исследователя, сделает больного неподходящим для исследования.

Беременные или кормящие (выделяющие молоко) женщины, когда беременность определяется как состояние женщины после зачатия и до окончания беременности, подтвержденная положительным лабораторным тестом на ХГЧ (> 5 мМЕ/мл). Женщины детородного потенциала, определяемые как все женщины, физиологически способные забеременеть, не допускаются к участию в этом исследовании, если они не используют высокоэффективные методы контрацепции на протяжении всего исследования и в течение 10 дней после прекращения приема исследуемого препарата.

Женщины после менопаузы могут принять участие в этом исследовании. Женщины считаются на-

ходящимися в постменопаузе и не детородного потенциала, если они имели 12 месяцев естественной (спонтанной) аменореи с соответствующим клиническим профилем (например, соответствующие возрасту, историю вазомоторных симптомов) или шесть месяцев спонтанной аменореи с уровнем сывороточного фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) >40 мМЕ/мл или имели хирургическую билатеральную овариэктомию (с или без гистерэктомии) или перевязку маточных труб, по меньшей мере за шесть недель до скрининга. В случае удаления только яичников, только тогда, когда репродуктивный статус женщины был подтвержден последующей оценкой уровня гормона, она считается не детородного потенциала.

Сексуально активные мужчины должны использовать презерватив во время полового акта при приеме препарата и в течение 3 месяцев после прекращения лечения и не должны зачинать детей в этот период. Презерватив должен быть использован также мужчиной после вазэктомии, с целью предотвращения доставки лекарства через семенную жидкость.

Экспериментальное лечение.

Исследуемые препараты, которые будут использованы в этом исследовании, представляют собой ингибитор B-Raf формулы (I), соединение B, соединение F, соединение H, соединение G и соединение C.

Процедуры экспериментального лечения представляют собой:

часть I: одиночное средство ингибитор B-Raf формулы (I),

часть II: двойные комбинации:

ингибитор B-Raf формулы (I) (QD) и соединение B (BID),

ингибитор B-Raf формулы (I) (QD) и соединение F (QD),

ингибитор B-Raf формулы (I) (QD) и соединение H (QD),

ингибитор B-Raf формулы (I) (QD) и соединение G (BID),

ингибитор B-Raf формулы (I) (QD) и соединение C (QD).

Режимы дозирования.

Таблица 2. Доза и график лечения

Процедуры экспериментального лечения	Лекарственная форма и способ введения	Начальная Доза (21 дневные циклы)
ингибитор B-Raf Формулы (I)	Капсулы для перорального применения	450 мг/день, или наивысшая допустимая доза
Соединение B	Таблетка для перорального применения	45мг BID
Соединение F	Капсулы для перорального применения	60мг
Соединение H	Капсулы для перорального применения	75мг
Соединение G	Капсулы для перорального применения	150 мг BID
Соединение C	Капсулы для перорального применения	200 мг

Инструкции по введению ингибитора B-Raf формулы (I)+второе средство.

Ингибитор B-Raf формулы (I), соединение F, соединение H и соединение C вводят перорально по ежедневному графику (QD) в ровно фиксированной дозе и вне зависимости от веса тела или площади поверхности тела.

QD Дозирование: пациенты должны быть проинструктированы, чтобы принимать капсулы с ингибитором B-Raf формулы (I) (и соединение F, соединение H или соединение C) ежедневно, запивая большим стаканом воды (~ 250 мл) утром. При приеме всех доз препарата, пациенты должны голодать в течение 2 ч до и после приема исследуемого препарата. Если пациент забывает принять дозу утром, то он/она должен принять дозу в течение 6 ч после пропущенной дозы. Если более чем 6 ч прошло, то от дозы нужно отказаться в этот день и пациент должен продолжать лечение со следующей запланированной дозы. Если по какой-либо причине завтрак не потребляется, то пациент должен по-прежнему принимать запланированную утреннюю дозу со стаканом воды. Если это происходит в дни полного взятия образцов для ФК, это должно быть задокументировано.

Соединение B и соединение G принимают перорально по графику два раза в день (BID) в ровно фиксированной дозе и вне зависимости от веса тела или площади поверхности тела.

ВІD Дозирование: дозы соединения В или соединения G должны быть приняты отдельно друг от друга в интервале 12 ± 2 ч. Пациенты будут проинструктированы для того, чтобы принимать дозы ежедневно, запивая большим стаканом воды (~ 250 мл) утром и вечером. Для комбинации ингибитора В-Raf формулы (I) и соединения G во время приема всех доз, пациенты должны голодать в течение 2 ч до и после приема исследуемого препарата. Для комбинации ингибитора В-Raf формулы (I) и соединения В во время приема всех утренних доз, пациенты не должны ничего есть в течение 2 ч перед приемом исследуемого препарата и воздерживаться от приема пищи в течение 2 ч после приема ингибитора В-Raf формулы (I) и соединения В. Во время приема всех вечерних доз пациенты должны голодать 1 ч до и после приема соединения В. Отметим, что оба препарата (ингибитор В-Raf формулы (I)+соединение В или соединение G) должны быть приняты вместе утром и только ВІD принимаемое лекарство (соединение В или соединение G) должно быть принято в вечернее время.

Инструкции для приема препарата в дни, когда выполняется забор образцов для ФК.

Образцы для ФК перед дозой должны быть взяты непосредственно перед приемом дозы.

При каждом посещении, ответственный персонал по месту проведения испытания будет следить за тем, чтобы соответствующие дозы каждого исследуемого препарата были приняты пациентом, и предоставлять пациенту правильное количество исследуемого препарата(ов) для последующего дозирования. Пациенты будут проинструктированы в отношении возврата по месту проведения испытания неиспользованных исследуемых препаратов при каждом посещении.

Пациенты должны быть проинструктированы в отношении того, чтобы глотать капсулы/таблетки целиком и не жевать или давить их.

Любые дозы, которые пропущены, не должны быть заменены или составлены во время следующего запланированного дозирования или на следующий день, в зависимости от того, когда доза применяется.

Пациенты должны избегать употребления грейпфрута, граната, карамболы, Севильского апельсина или содержащих их сок продуктов в течение всего исследования и предпочтительно за 7 дней до первой дозы исследуемого препарата, в связи с потенциальным взаимодействием СYP3A4 с исследуемыми лекарственными препаратами. Употребление апельсинового сока допускается.

Если возникает рвота и/или диарея во время курса лечения, не допускается повторное дозирование для пациента до момента следующей запланированной дозы. Появление и частоту либо рвоты и/или диареи (или повышенной частоты стула) в течение 4 ч после приема препарата следует отметить в разделе побочные эффекты (ПЭ) электронной индивидуальной регистрационной карты (ЭИРК). Кроме того, в дни взятия образцов для полной ФК, время начала каких-либо эпизодов рвоты в течение первых 4 ч после приема дозы в этот день должны быть отмечены в соответствии с листом назначений ЭИРК.

Исследователь или ответственный персонал по месту проведения испытания должен проинструктировать пациента принять исследуемые препараты согласно протоколу (содействовать соблюдению). Все предписания и распределения доз для пациента, все изменения дозы, все пропущенные приемы доз во время исследования должны быть записаны в листе назначений ЭИРК. Ответственность по препарату должна быть выполнена на регулярной основе. Пациенты будут проинструктированы в отношении возврата неиспользованных исследуемых препаратов по месту проведения испытания в конце каждого цикла. Персонал по месту проведения испытания будет следить за тем, чтобы соответствующие дозы каждого исследуемого препарата были приняты пациентом при каждом посещении, и предоставлять пациенту правильное количество препаратов для последующего дозирования.

Для комбинированного направления с использованием ингибитора В-Raf формулы (I) в комбинации только с соединением F

Инструкции для назначения в дни, когда выполняется натошак мониторинг глюкозы в плазме крови: в дни мониторинга глюкозы в плазме крови натошак пациенты должны голодать в течение ночи по меньшей мере 8 ч до забора крови. Легкий завтрак/закуски могут употребляться после измерения глюкозы в плазме крови натошак. Ингибитор В-Raf формулы (I) (и соединение F, если оно применяется) может быть принят через 2 ч после завтрака. Пациенты должны продолжать голодание в течение 2 ч после приема ингибитора В-Raf формулы (I) (и соединения F, если оно применяется).

Продолжительность лечения.

Пациенты могут продолжать лечение с ингибитором В-Raf формулы (I) в качестве монотерапии до момента испытывания непереносимой токсичности и/или прекращения лечения по усмотрению исследователя или отзыва информированного согласия. При прогрессировании заболевания, после лечения ингибитором В-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства, пациентам будет назначаться комбинированная терапия в соответствии с генетическими изменениями, определенными в биопсии при рецидиве. Пациенты не могут продолжать комбинированное лечение, пока они испытывают непереносимую токсичность, прогрессирование заболевания и/или, если лечение прекращено по усмотрению исследователя или отозвано информированное согласие.

Руководство по повышению дозы.

Обоснование для назначения начальной дозы.

Ингибитор В-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства.

Доза для ингибитора В-Raf формулы (I) для пациентов, вошедших в первую часть этого испытания,

устанавливается на уровне 450 мг QD, что соответствует P2ФД одиночного средства. Выбор начальной дозы соответствует рекомендациям руководства по доклинической оценке противоопухолевых лекарственных препаратов ICH S9 для выбора начальной дозы для первого исследования на человеке, проведенного на пациентах с раком, и представлен в табл. 6-2.

Ингибитор B-Raf формулы (I) в комбинации с соединением В.

Начальная доза для ингибитора B-Raf формулы (I) плюс соединение В устанавливается для ингибитора B-Raf формулы (I) 600 мг QD и соединения В 45 мг BID или наивысшая доза для комбинации с доказанной безопасностью.

Ингибитор B-Raf формулы (I) в комбинации со вторым средством (соединение F, соединение H, соединение G или соединение C):

Во второй части этого испытания начальные дозы для ингибитора B-Raf формулы (I) и второго средства будут, соответственно, 450 мг QD (P2ФД) или наивысшая переносимая доза ингибитора B-Raf формулы (I) и самая наивысшая доза второго средства, допускаемая БМЛР (см. табл. 3).

P2ФД для ингибитора B-Raf Формулы (I) была заявлена как 450 мг QD.

Качественная оценка взаимодействия "препарат-препарат" (ВПП) прогнозирует отсутствие существенного влияния на действие ингибитора B-Raf формулы (I) или соединения F, когда они принимаются совместно. Количественный анализ с использованием симулятора SimCYP подтвердил эту оценку. Следовательно, начальная доза для этой комбинированной пары выбирается так, чтобы соответствовать установленной в данный момент P2ФД для ингибитора B-Raf формулы (I) и 75% МПД для соединения F: 450 мг QD ингибитора B-Raf Формулы (I) и 75 мг соединения F.

Количественная оценка ВПП с использованием симулятора Simcyp предсказывает минимальные изменения в действии ингибитора B-Raf формулы (I) при совместном приеме с соединением H. При дозе ингибитора B-Raf формулы (I) 450 мг ожидается, что действие (максимальная концентрация (C_{max}) и площадь под кривой (AUC)) соединения H снижнется на 20-40%. Следовательно, начальная доза для этой комбинированной пары выбирается так, чтобы соответствовать установленной в данный момент P2ФД для ингибитора B-Raf формулы (I) и 60% МПД для соединения H: 450 мг QD ингибитора B-Raf формулы (I) и 75 мг соединения H.

Количественная оценка ВПП с использованием симулятора Simcyp предсказывает увеличение на 76 и 43% AUC и C_{max} ингибитора B-Raf формулы (I) соответственно, также, как и снижение на 54 и 36% AUC и C_{max} соединения G, соответственно, когда 450 мг QD ингибитора B-Raf формулы (I) и 150 мг BID соединения G принимаются совместно. В клинике, ингибитор B-Raf формулы (I) был протестирован в дозе до 700 мг QD и наблюдаемые побочные эффекты являются обратимыми и контролируруемыми, следовательно, потенциальное ВПП между двумя молекулами, которое может привести к потенциально повышенной концентрации ингибитора B-Raf формулы (I), чем та, которая была установлена в настоящее время P2ФД, не представляет собой риска, так как побочные эффекты являются наблюдаемыми, контролируруемыми и обратимыми. Начальная доза для этой комбинированной пары выбирается так, чтобы соответствовать установленной в данный момент P2ФД для ингибитора B-Raf формулы (I) и 50% МПД для соединения G: 450 мг QD ингибитора B-Raf формулы (I) и 150 мг соединения G.

Количественная оценка ВПП с использованием симулятора Simcyp предсказывает увеличение на 43 и 20% увеличение AUC и C_{max} ингибитора B-Raf формулы (I), соответственно, также, как и снижение на 43 и 37% AUC и C_{max} соединения C, соответственно, когда 450 мг QD ингибитора B-Raf формулы (I) и 300 мг соединения C принимаются совместно. В клинике, ингибитор B-Raf формулы (I) был протестирован в дозе до 700 мг QD и наблюдаемые побочные эффекты являются обратимыми и контролируруемыми, следовательно, потенциальное ВПП между двумя молекулами, которое может привести к потенциально повышенной концентрации ингибитора B-Raf формулы (I), чем та, которая была установлена в настоящее время P2ФД, не представляет собой риска, так как побочные эффекты являются наблюдаемыми, контролируруемыми и обратимыми. Начальная доза для этой комбинированной пары выбирается так, чтобы соответствовать установленной в данный момент P2ФД для ингибитора B-Raf формулы (I) и ~ 23% дозы протестированной на данный момент на уровне дозирования в 900 мг QD, так как максимально переносимой дозы (МПД) для соединения C не было достигнуто: 450 мг QD ингибитора B-Raf Формулы (I) и 200 мг соединения C.

В этом исследовании фармакокинетические показатели для всех партнеров по комбинации, а также их активных метаболитов (если это возможно) будут оцениваться как можно скорее в стационарном состоянии и по сравнению с данными, полученными в соответствующих исследованиях монотерапии для оценки потенциального взаимодействия препарат-препарат.

До того, как будет назначена доза для первого пациента с применением одной из комбинаций, Байесовская модель для этой комбинации будет обновлена при помощи самых последних данных из текущего испытания одиночного средства для подтверждения, что предлагаемые начальные дозы для ингибитора B-Raf формулы (I) и второго средства являются все еще допустимыми (т.е. отвечают критерию КПУД). Если предложенная начальная доза не отвечает критериям, будет использована более низкая доза для комбинации, которая отвечает критерию КПУД.

Уровни предварительного дозирования.

Табл. 3 описывает начальные дозы и уровни предварительного дозирования в процедурах экспериментального лечения для комбинаций, которые могут оцениваться в ходе этого испытания. Дополнительные уровни дозирования, неопределенные в настоящее время, могут быть включены в исследование и дополнительные пациенты могут быть включены в исследование с применением уже испытанных доз, если такие изменения будут сочтены необходимыми для получения оптимальных данных по безопасности и переносимости, фармакокинетики и фармакодинамике.

Таблица 3. Уровни предварительного дозирования

Уровень дозирования* (мг)	Ингибитор В-Raf QD	Соед. В	Соед. F	Соед. H	Соед. G	Соед. C
		БID	QD	QD	БID	QD
-2**	150	15	30	25	50	100
-1**	300	30	40	50	100	150
1 (начальная доза)	450 (600 для направления с использованием Соединения В)	45 (P2ФД)	60	75	150	200
2	450	-	80	100	200	400
3	450	-	100 (MTD)	125 (MTD)	250	700
4	450	-	-	-	300	900

* - возможными являются дополнительные и/или промежуточные уровни дозирования для добавления в ходе исследования Групп, которые могут быть добавлены на любом уровне дозировки ниже уровня MTD, в целях лучшего понимания безопасности, ФК или ФД.

** - уровень дозирования -1 и -2 также будет использован для пациентов, требующих снижения дозы, по сравнению с уровнем начальной дозы. Снижение дозы ниже уровня дозирования -2 не допускается для данного исследования.

Вариант реализации решения о повышении дозы Решение по повышению дозы для второго средства будет иметь место после оценки индивидуальной переносимости пациентом двойной комбинации в течение первых 21 дня цикла.

Для реализации варианта решения о повышении дозы, имеющаяся информация по токсичности (включая неблагоприятные события и лабораторные аномалии, которые не относятся к ДЛТ), рекомендации по БМЛР и доступная информация по ФК и ФД, все это будет оцениваться в ходе принятия решения о дозировке. Применение препарата в более высокой дозировке не осуществляется до тех пор, пока исследователь не получит письменное подтверждение, что результаты по предыдущему уровню дозирования были оценены и что они являются допустимыми для перехода к более высокой дозировке. Если принимается решение увеличивать дозирование до более высокой дозировки, но один или более дополнительный(е) пациент(ы) на предыдущем уровне дозы испытывает ДЛТ в течение первого цикла лечения, то БМЛР будет обновлена с использованием этой новой информации, прежде чем какие-либо дополнительные пациенты перейдут к более высокой дозировке.

Процесс увеличения дозирования будет осуществляться поэтапно и будет продолжаться в группе из 3 пациентов. Только второе средство, соединение F, соединение H, соединение G или соединение C будет увеличено в дозировании в соответствии с БМЛР.

Не допускается увеличение индивидуальной дозы для пациента в любое время в рамках части I лечения ингибитором В-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства.

Увеличение индивидуальной дозы второго средства разрешается во второй части комбинированной терапии, за исключением пациентов, участвующих в направлении лечения ингибитором В-Raf формулы (I)+соединение В, которые будут подвергаться лечению по заявленной P2ФД комбинации ингибитора В-Raf формулы (I) и соединения В (45 мг BID).

В целях лечения пациента более высокой дозой соединения F, соединения H, соединения G или соединения C, он или она должен иметь переносимость нижней дозы комбинации по меньшей мере в течение 1 цикла терапии (например, он или она не должны испытывать изначальную токсичность при более низкой паре доз по шкале общих критериев терминологии для нежелательных явлений (ОКТНЯ) уровня ≥ 2 , для которых принадлежность к исследованию препаратов не может быть изменена). Кроме того, новая более высокая доза для пары соединений, с применением которой пациент подвергается лечению, должна соответствовать модифицированному критерию КПУД, используемому для увеличения индивидуальной дозы (дополнительные ссылки к разделу).

Пациенты, недавно включенные в следующую группу, будут начинать лечение в дозе, установленной во время последнего совещания по увеличению дозы. Байесовская модель логистической регрессии (БМЛР) и границы индивидуальной дозы для пациента затем будут обновляться для следующей группы.

Прерывание лечения и прекращение лечения.

Если пациент нуждается в отсрочке получения дозы ингибитора В-Raf формулы (I), соединения В, соединения F, соединения H, соединения С или соединения G на >21 последовательных дней от предполагаемого числа следующей запланированной дозы, то пациент должен быть исключен из экспериментального лечения. В исключительных ситуациях, если экспериментальное лечение приносит явную пользу пациенту (т.е. происходит стабилизация заболевания, частичный ответ на лечение, полный ответ на лечение), и по мнению исследователя не присутствуют проблемы безопасности, пациент может оставаться на экспериментальном лечении дозировкой, уровень которой установлен на основе безопасности.

Предварительный молекулярный скрининг.

Информированное согласие на проведение предварительного молекулярного скрининга.

Информированное согласие на проведение предварительного молекулярного скрининга должно быть подписано до момента проведения любой, связанной с исследованием, процедуры предварительного молекулярного скрининга (не применимо, если мутационный статус BRAF уже был оценен вне исследования). Это применимо только к пациентам части 1.

Мутационный статус BRAF по свежему или архивному материалу биопсии.

Для начала скрининговой фазы исследования пациенты должны иметь письменную документацию мутации BRAF V600, которая должна быть получена на месте на свежей биопсии опухоли (предпочтительно) или на самом последнем архивном материале образца опухоли. Информированное согласие на проведение предварительного молекулярного скрининга должно быть подписано до момента проведения любой, связанной с исследованием, процедуры предварительного молекулярного скрининга (не применимо, если мутационный статус уже был оценен вне исследования).

После того, как мутация V600 кодона BRAF (например, V600E/K/D/R) подтверждена уполномоченной местной лабораторией и задокументирована на месте проведения испытания, пациент может начать процедуру скрининга.

Период лечения.

Период лечения разделен на две части.

Часть I: пациенты, "наивные" по отношению к ингибитору BRAF, будут принимать дозу ингибитора В-Raf формулы (I) непрерывно на протяжении 21-но дневного (3 календарных недели) цикла, начиная от дня 1 цикла 1. Между циклами не будет никакого запланированного перерыва. Пациенты будут получать ингибитор В-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства до начала комбинированного лечения после прогрессирования заболевания или появления непереносимой токсичности, вне зависимости от того, что произойдет раньше.

Часть II: пациенты, которые получали ингибитор В-Raf формулы (I) по меньшей мере в течение одного 21-дневного цикла и заболевание которых прогрессирует, войдут в часть II, чтобы получать комбинированное лечение ингибитором В-Raf формулы (I)+второе средство, выбранное на основании генетических изменений, определенных в биопсии опухоли при рецидиве.

Нет фиксированной длительности лечения; пациенты могут продолжать лечение с ингибитором В-Raf формулы (I) в качестве одиночного средства до момента начала комбинированного лечения и первого случая прогрессирования заболевания, возникновения непереносимой токсичности, которая исключает дальнейшее лечение и/или лечение прекращается по усмотрению исследователя или отказа пациента (отзыв информированного согласия). При первом случае прогрессирования заболевания, когда известны результаты анализа биопсии, пациенты могут инициировать комбинированное лечение с ингибитором В-Raf формулы (I)+второй ингибитор до момента второго случая прогрессирования заболевания, возникновения непереносимой токсичности, которая исключает дальнейшее лечение и/или лечение прекращается по усмотрению исследователя или отказа пациента (отзыв информированного согласия).

Если пациент остается в исследовании несмотря на необходимость прерывания дозы на >21 день, поскольку больной испытал объективные доказательства клинической эффективности, по мнению исследователя в интересах пациента оставаться в исследовании.

Байесовская модель логистической регрессии.

Адаптивная БМЛР, которая руководствуется принципом КПУД, будет контролировать увеличение дозы каждого из исследуемых лекарств (соединение F, соединение H, соединение G или соединение С) в сочетании с ингибитором В-Raf формулы (I) по их соответствующим МПД/Р2ФД. Для каждой комбинации, БМЛР для комбинированного лечения будет рассчитана с учетом 5-ти параметров по данным дозопонижающей токсичности цикла 1 (т.е. наличия или отсутствия ДЛТ), полученных в течение увеличения дозы для моделирования взаимосвязи доза-токсичность для соединения F, соединения H, соединения G или соединения С в комбинации с ингибитором В-Raf формулы (I).

Описание моделей БЛР, предшествующие распределения для параметров модели (на основе имеющейся в настоящее время информации о средствах направленного действия) и сопутствующие показатели, предшествующие распределению ДЛТ, представлены в приложении 1.

Рекомендация дозы.

Рекомендация дозы для партнера по комбинации обусловлена дозой ингибитора B-Raf формулы (I), которая может отличаться между пациентами, входящими в часть II. Эта рекомендация будет основываться на самых последних заключениях уровня ДЛТ, включая среднее, медиану, стандартное отклонение, 95% доверительный интервал и вероятность того, что истинный уровень ДЛТ для каждой комбинации дозы лежит в пределах следующих категорий: [0, 16%] пониженная доза [16, 35%] направленная токсичность [35, 100%] чрезмерная токсичность.

Следуя принципу КПУД, после каждой группы пациентов.

рекомендуемая доза для комбинации представляет собой дозу с наибольшей последующей вероятностью ДЛТ в целевом интервале [16, 35%] среди доз, удовлетворяющих критерию передозировки, который представляет собой вероятность чрезмерной токсичности, которая меньше чем 25%. Кроме того, максимальное увеличение дозы для комбинации внутри группы на протяжении исследования двух препаратов ограничено до 100%, где 100% означает сумму относительного увеличения для каждого из исследуемых препаратов, т.е. 0 и 100% для ингибитора B-Raf формулы (I) (доза для которого не может превышать 450 мг) и для второго средства направленного действия (доза для которого не может выйти за пределы его МПД/Р2ФД, если таковые измерения проводились) соответственно.

Увеличение индивидуальной дозы для пациента для партнера по комбинации будет ограничено до 50% и будет руководствоваться БМЛР согласно последующему модифицированному критерию КПУД, который отражает индивидуальную переносимость пациента: пациент сможет увеличить индивидуальную дозу до дозы, для которой существует менее чем 40% вероятность чрезмерной токсичности. Кроме того, если связанные с лечением явления токсичности класса 2 по шкале ОКТНЯ наблюдаются у 2 или более пациентов при уровне дозирования или, если кто-либо из пациентов испытывает токсичность класса 3 или выше, увеличение дозы партнера по комбинации будет $\leq 25\%$ для любого последующего увеличения дозы.

Клиническое обобщение имеющейся информации о токсичности.

(в том числе ПЭ, которые не относятся к ДЛТ), ФК, ФД и информации об эффективности, а также рекомендации байесовской модели, будут использоваться для определения дозы комбинации для следующей группы в ходе совещания по увеличению дозы. Исследователи и клинический персонал будут участвовать в принятии решений.

Модель для любой комбинации будет пересмотрена перед зачислением каких-либо дополнительных пациентов в группу, если первые 2 обследованных пациента в группе испытали ДЛТ до зачисления 3 пациента. Окончательная рекомендуемая МПД/Р2ФД для каждой комбинации будет основываться на обсуждениях рекомендации, полученной с использованием БМЛР и на общей оценке безопасности, принимая во внимание данные толерантности из последующих циклов по всем различным комбинациям тестируемых доз.

Пример 2.

Материалы и методы.

Маточные растворы соединений готовили в ДМСО в конечной концентрации 10 мМ. Рабочие растворы серийно разводили в соответствующей среде для культивирования клеток с шагом в 3 раза, чтобы достичь конечной концентрации в диапазоне от 2,7 мкМ до 1,2 нМ.

Клеточные линии, культура клеток, измерение жизнеспособности клеток.

Клетки A-375 и WM-266-4 были приобретены из Американской коллекции типовых культур (АКТК). Клетки A-375 культивировали в среде DMEM (АКТК) и клетки WM-266-4 культивировали в среде EMEM (АКТК), обе среды были дополнены 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и инкубировались при 37°C/5% CO₂. Клеточные линии, модифицированные генно-инженерным путем для экспрессии общераспространенных аллелей, указывающих на резистентность, были приобретены у Novartis-Emergyville. Эти модели резистентности включают клетки A-375, экспрессирующие мутантную MEK1P124L, усеченную p61-BRAFV600E или мутантный NRASQ61K и клетки WM-266-4, экспрессирующие мутантную MEK1C121S, усеченную p61-BRAFV600E или мутантный NRASQ61K. Эти клетки культивировали в соответствующей среде с добавлением селективного маркера G418 и в присутствии 5 мкМ LFE158 (мутантная форма MEK) или L1H720 (усеченная киназа p61-BRAFV600E).

Схема планшета, распределение клеток и добавление соединения.

Для скрининга клетки высевали в 80 мкл среды в 384-луночные планшеты (Thermo Scientific, кат. № 4332) при плотности клеток 500 (A-375) или 750 (WM-266-4) клеток на лунку с использованием MultiDrop Combi (Thermo-Fisher) со стандартной 8-канальной кассетой. Для обеспечения равномерного распределения клеток по всей внутренности лунки, клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение короткого периода времени и инкубировали при комнатной температуре 30 минут. Все планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч до момента добавления соединения. Маточный раствор соединения был приготовлен непосредственно перед исследованием в соответствующей культуральной среде и добавлялся при помощи PAA робота, оснащенного контактными инструментами, объемом в 200 нл. Минимум в трех повторяющихся лунках эффект одиночного средства и комбинации был оценен после 72 ч инкубации путем количественной оценки уровня клеточного АТФ с помощью Cell Titer Glo

(Promega) в соответствии с протоколом производителя и микроскопической визуализацией. Для визуализации, клетки фиксировали в планшетах и пермеабилizировали раствором 10% ПФА, 0,3% ТХ-100 в НФБ с помощью дозатора WellMate с контролируемой скоростью дозирования. Ядра клеток окрашивали при помощи Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen) и все необходимые этапы промывки проводились с использованием вошера BioTek.

Автоматизированный анализ изображения.

Изображения, полученные при помощи InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare, 28-9534-63) были в формате TIFF и имели размер 2048x2048 пикселей, захватывая всю лунку 384-луночного планшета. Автоматизированный анализ данных был сделан с помощью оригинальных скриптов в открытом доступе, статистического программного языка R и функций из пакета BioConductor из EBIImage. Целью было определить число жизнеспособных ядер (клеток) на лунку в качестве приблизительного показателя жизнеспособности клеток. Программная последовательность состоит из семи этапов: (I.) сглаживание изображения, чтобы уменьшить количество пиков интенсивности, (II.) применение пороговой функции для разделения переднего плана (сигнала) от фона (шума), (III.) определение локальных максимумов на переднем плане, что служат для отсева ядер, (IV.) фильтрации локальных максимумов, находящихся в непосредственной близости, (V.) вычисление ядер из оставшихся локальных максимумов, (VI.) и извлечения свойств объекта от вычисленных ядер (число ядер, их размер и интенсивность сигнала). В качестве последнего этапа (VII), чтобы исключить обломки клеток (например, фрагментированные ядра) из подсчета, объекты, определенные в лунках, обработанных ДМСО и Стауроспорином, были использованы для получения функций распределения для жизнеспособных и фрагментированных ядер, соответственно. Они были использованы для определения границы для показателей различий между жизнеспособными и фрагментированными ядрами. Количество фрагментированных ядер вычитали из общего числа идентифицированных объектов и результат был задокументирован как конечное количество для этой лунки.

Нормализация данных.

Данные, состоящие из трех измерений для каждого варианта (соединения) обработки, 42 повтора обработанных ДМСО лунок и 2 повтора для обработанных Стауроспорином лунок. Данные были нормализованы к медиане измерений ДМСО и обобщены путем расчета медианы из трех повторов. Данные были импортированы в Chalice для расчета синергии для соединения.

Таблица 4. Диаграмма значений IC₅₀ для одиночного средства и оценка синергии для комбинации, как определено с использованием CTG-анализа на основе АТФ

Родитель- ская Клеточная Линия	Аллели Резистент- ности	Соед. Формулы (I) IC50 (нМ)	Соед. В IC50 (нМ)	Комбинация Избыточная Синергия Леве
A-375	-	4	51	3,0
A-375	MEK1 ^{R124L}	333	>2700	7,8
A-375	p61 BRaf ^{V600E}	576	961	4,6
A-375	NRAS ^{G61K}	134	206	4,3
WM-266-4	-	2	50	4,2
WM-266-4	MEK1 ^{C121S}	35	821	5,4
WM-266-4	p61 BRaf ^{V600E}	906	>2700	5,8
WM-266-4	NRAS ^{G61K}	1122	>2700	5,1

Таблица 5. Диаграмма значений IC₅₀ для одиночного средства и оценка синергии для комбинации, как определено с использованием микроскопического анализа

Родитель- ская Клеточная Линия	Аллели Резистент- ности	Соед. Формулы (I) IC ₅₀ (нМ)	Соед. В IC ₅₀ (нМ)	Комбинация Избыточная Синергия Леве
A-375	-	4	57	2,4
A-375	MEK1 ^{P124L}	300	>2700	9,3
A-375	p61 BRAF ^{V600E}	849	969	5,9
A-375	NRAS ^{G61K}	133	150	4,6
WM-266-4	-	3	77	4,7
WM-266-4	MEK1 ^{C121S}	58	1210	6,3
WM-266-4	p61 BRAF ^{V600E}	933	>2700	6,8
WM-266-4	NRAS ^{G61K}	868	>2700	4,5

Пример 3.

Эффекты от одиночного средства и комбинации в виде ингибиторов RAF (соединение формулы (I)) и PI3Kα (соединение X) киназ на пролиферацию семи мутантных по BRAF клеточных линий CRC. Все клеточные линии экспрессируют протеин BRAFV600E. Клетки, несущие известные или предполагаемые активирующие мутации в гене PI3Kα отмечены как (*) и клетки с потерей PTEN отмечены как (#). Пролиферацию клеток измеряли через 72 ч при помощи cell titer glo™ анализа и все полученные результаты представляют собой результат по меньшей мере трехкратных измерений. Показаны значения IC₅₀ для соединения формулы (I) и соединения X в качестве одиночного средства. Измерения степени синергии (SS), а также индекс для комбинации (CI₅₀) при 50% от эффекта, приведены для каждой комбинации в табл. 6. Взаимодействия считались как синергетические, когда значения SS были ≥2,0 и значения CI ≤0,5. Взаимодействия считались как аддитивные/синергетические, когда значения SS были ≥2,0, но значения CI >0,5 или SS значения были <2,0, но значения CI были ≤0,5. Взаимодействия обозначались как аддитивные, когда значения SS были <2,0 и значения CI >0,5. Обозначения для синергии приведены в столбце "Сущность эффекта".

Таблица 6

Комбинации соед. Формулы (I) с соед. X в клеточных линиях CRC мутантных в BRAF ^{V600E}						
Название клеточ- ной линии	Тип рака	Соед. X формулы (I)		Комбинация		
		IC ₅₀ [нМ]	IC ₅₀ [нМ]	SS	CI ₅₀	Описание эффекта
SW1417	CRC	235	>2700	2,46 ± 0,06	0,27 ± 0,04	синергетический
COLO 205	CRC	5,0	>2700	3,80 ± 0,06	0,69 ± 0,01	Аддитивный/ синергетический
LS411N	CRC	18	>2700	2,76 ± 0,07	0,49 ± 0,03	синергетический
CL-34	CRC	30	>2700	4,48 ± 0,1	0,57 ± 0,03	Аддитивный/ синергетический
HT-29*	CRC	49	>2700	4,31 ± 0,06	0,21 ± 0,02	синергетический
RKO*	CRC	1965	>2700	5,24 ± 0,05	0,22 ± 0,01	синергетический
SNU-C5*	CRC	>2700	>2700	2,44 ± 0,1	0,47 ± 0,07	синергетический
OUMS-23 [#]	CRC	>2700	>2700	0,64 ± 0,06	N/C	синергетический

Пример 4.

Этот Пример направлен на исследование влияния соединения формулы (I) и соединения F в виде одиночных средств и в комбинации на рост моделей клеточных линий HT-29 и RKO in vivo. Концентрация и схема дозирования для ингибиторов составляли 50 мг/кг q.d (соединение формулы (I)) и 32,7 мг/кг q.d (соединение F). Все соединения вводили в составе комбинации в тех же дозах, в каких они были в

виде одиночного средства. Дозирование было остановлено на 28 день для модели НТ-29 и после 21 дня для модели РКО. Результаты представлены на фиг. 1 и 2 соответственно.

Пример 5.

Все клеточные линии были получены из АКТК (SK-MEL-5, SK-MEL-24, UACC-62, COLO 741, CO-LO-800, WM-266-4, Colo205, LS411N, SW 1417), ЕККК (MDST8), DSMZ (CL-34) и НИР (LOX IMVI). Клетки культивировали в среде RPMI1640 (АКТК, номер по каталогу 30-2001) или DMEM (АКТК, Номер по каталогу 30-2002) с добавлением 10% (или 20% для CL-34 клеток) ФБС (GIBCO, номер по каталогу 10099-141) в соответствии с рекомендациями производителей. Клеточные линии культивировали при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе и пересеивали во флаконы Т-75. Во всех случаях, клетки оттаивали из замороженных запасов, культивировали в течение ≥1 пассажа с использованием разведения 1:3, подсчитывали и оценивали жизнеспособность с помощью счетчика ViCell (Beckman-Coulter) перед тем, как сеять в 96-луночные или 6-луночные планшеты. Для того чтобы разделить и рассеять клеточные линии, клетки извлекались из флаконов с использованием смеси 0,25% трипсин-ЭДТА (GIBCO, номер по каталогу 25200). Все клеточные линии были проверены на предмет отсутствия контаминации микоплазмой, как это было выявлено с помощью методики для определения с использованием ПЦР, выполненной на базе Idexh Radil (Колумбия, Миссури, США), и правильность идентификации клеточных линий была подтверждена при помощи панели одиночных нуклеотидных полиморфизмов (ОНП).

Соединение формулы (I) и соединение Н растворяли в 100% ДМСО (Cellgro, номер по каталогу 25-290-CQC) в концентрации 10 мМ и хранили при -20°C до момента использования. Соединения были последовательно разведены с шагом в 3 раза семь раз в 96-луночных планшетах с объемом лунки 2 мл (Greiner Bio-One, номер по каталогу 780271), обеспечивая диапазон концентрации от 22 нМ до 16200 нМ. Рекombинантный человеческий основной FGF был приобретен у R&D system (номер по каталогу 233-FB) и переведен в форму суспензии с концентрацией 50 мкг/мл в стерильном НФБ. Он был использован в фиксированной концентрации 100 нг/мл во всех экспериментах.

Для анализа CellTiter-Glo™, клетки переносили в обработанные 96-луночные планшеты для культур тканей (Costar, номер по каталогу 3904) для получения конечного объема 80 мкл среды и при плотности в 3000 клеток на лунку. В течение от 12 до 24 ч после посева, 20 мкл каждая серия разведения соединения была перенесена в планшет, содержащий клетки, в результате чего диапазон концентраций соединения составлял от 2700 до 3,7 нМ при 3-кратном разведении, и конечная концентрация ДМСО составляла 0,16%. Общий объем в каждой лунке составлял 120 мкл. Планшеты инкубировали в течение 72 ч и влияние соединений на пролиферацию клеток определяли с использованием люминисцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo™ (CTG, Promega) и планшетного ридера Victor™ X4 (Perkin Elmer). Для анализа роста клеток в реальном времени, клетки высевали в xCELLigence Е-планшеты (Roche, номер по каталогу 05232368001) при плотности 4000 клеток на лунку в общем объеме среды 90 мкл и, спустя 24 ч после посева, 11 мкл среды, с или без соединения, было добавлено в лунки. 2-4 повтора лунок были засеяны для всех клеточных линий и обрабатываемых групп, за исключением клеток COLO 741, обработанных LGX818+FGF2 (n=1). Там, где указанные конечные концентрации соединений и ростового фактора составляли 1 мкМ для соединения Н, 100 нг/мл для FGF2 и 100 нМ (SK-MEL-5) или 500 нМ (COLO 741) для соединения формулы (I). Состояние клеток постоянно оценивали каждые два часа в течение семи дней с измерением полного сопротивления в режиме реального времени с использованием клеточного анализатора xCELLigence. Полное сопротивление измеряли с использованием электродов на Е-планшетах, с увеличением охвата площади поверхности клеток, создавая большее сопротивление на электроде. Полное сопротивление на электроде отображалось в виде значений клеточного индекса, и использовалось в качестве условной величины для оценки жизнеспособности и количества клеток. Во всех случаях, значения клеточного индекса были нормированы к точке времени непосредственно после добавления соединения.

Для Вестерн-анализа, клетки высевали в 6-луночные планшеты (Costar, номер по каталогу 3506) при плотности 5×10⁵ клеток на лунку в 2,0 мл полной культуральной среды. В период от двенадцати до 24 ч после посева, клетки обрабатывали различными соединениями и во всех экспериментах соединение формулы (I), соединение Н и FGF2 были использованы в конечных концентрациях 100 нМ, 1,0 мкМ и 100 нг/мл, соответственно. Клетки собирали с использованием свежеприготовленного буфера для лизиса клеток (Cell Signaling Technology номер по каталогу 9803); дополненный ингибиторами фосфатазы (PhosStop, Roche номер по каталогу 04906845001) и протеазы (Roche, номер по каталогу 11697498001) через 2 и 24 ч после добавления соединения. Протеины из клеточных лизатов были разделены при помощи электрофореза в NuPAGE 4-12% Bis-Tis геле средних размеров (Novex, номер по каталогу WG1402BX10), перенесены на нитроцеллюлозные мембраны, которые, в дальнейшем, инкубировали с антителами от Cell Signaling Technology (Danvers, Массачусетс, США), распознающие фосфорилированную форму АКТ (S473, Номер по каталогу 4058), общее количество АКТ (номер по каталогу 2920), фосфорилированную форму ERK1/2 (T202/Y204, номер по каталогу 9101), общее количество ERK1/2 (номер по каталогу 9107), фосфорилированную форму MEK1/2 (S217/221, номер по каталогу 9121) и β-актин (Ambion, номер по каталогу AM4302). Вестерн-блоты проявляли путем инкубации с IRDye 680RD анти-

тeлaми кoзы, прoтив IgG крoля (Li-Cor, нoмeр пo кaтaлoгу 926-68071) и IRDye 800 CW aнтитeлaми кoзы, прoтив IgG мьшeи (Li-Cor, нoмeр пo кaтaлoгу 926-32210), скaнирoвaли с иcпoльзoвaниeм инфрaкpacнoй cиcтeмы визуaлизaции Odyssey (Li-Cor, Линкoльн, Нeбрaскa, CШA). Чтoбы oпpeдeлить, мoжeт ли FGFR cпococoбствoвaть выживaнию oпpeдeлeннoй cубпoпуляций клeтoчнoй линии, мутaнтнoй пo BRAFV600E, oбpaбoтaннoй coeдинeниeм фoрмулы (I), aнтипрoлифeрaтивнoй эффeкты этoгo coeдинeния были иccлeдoвaны нa oдинaдцaти клeтoчнoй линии T1799, мутaнтнoй пo BRAF, в приcутcтвии или в oтcутcтвии aктивaциoннoгo лигaндa FGFR FGF2. При oтcутcтвии FGF2, величинy IC₅₀ в шecти мeлaнoмaх и пяти клeтoчнoй линии CRC нaхoдились в диапaзoнe oт 3,0 дo 470 нM и oт 4,0 дo 185нM, cooтвeтcтвeннo (тaбл. 7). Величинy IC₅₀, иcмeрeннoй для шecти клeтoчнoй линии, были неизмeннoй в приcутcтвии FGF2, oднaкo, для oтaвщиx пяти клeтoчнoй линии oтвeт нa coeдинeниe фoрмулы (I) был либo знaчитeльнo умeньшeн (нaпpимeр, для CL-34), или пoлнocтью oтcутcтвoвaл (нaпpимeр, для LS411N). Тaким oбpaзoм, приcутcтвие FGF2 cпococoбствoвaет выживaнию cубпoпуляций BRAFV600E клeтoчнoй линии мeлaнoмa при aнти-прoлифeрaтивнoм вoздeйcтвии ингибитoрa B-Raf фoрмулы (I). Кpoмe тoгo, aнaлoгичнoй эффeкты нaблюдaются в клeтoчнoй линии, c мутaцией BRAFV600E, пoлучeннoй из oпуxoлeй при CRC.

Таблица 7

Название клеточной линии	Тип рака	BRAF	PTEN	LGX818 IC ₅₀ [нM]	LGX818 + FGF2 IC ₅₀ [нM]
SK-MEL-5	кожа	мут	дт	15	>1000
SK-MEL-24	кожа	мут	мут	470	369
UACC-62	кожа	мут	мут	2,0	4
COLO 741	кожа	мут	дт	53	2652
COLO-800	кожа	мут	дт	9	12
WM-266-4	кожа	Мут**	мут	3	4
CL-34	CRC	мут	дт	38	730,0
Colo 205	CRC	мут	дт	4	5
LS411N	CRC	мут	дт	185	9232
MDST8	CRC	мут	Не известно	141	10000
SW1417	CRC	мут	дт	165	364

Значения IC₅₀ для соединения формулы (I), в качестве одиночного средства, с или без добавления 100 нг/мл FGF2 для панели клеток меланомы T1799 мутантных по BRAF и линий клеток CRC. Статус мутантного (мут) и дикого типа (дт) был определен из опубликованных данных. Все BRAF мутации приводили к V600E замене, за исключением случаев с MDST8 (мут *) и WM-266-4 (мут **), которые имели замены V600K и V600D соответственно. Обозначения PTEN мут представляют обобщенное понятие, включающее мутацию, число копий гена и информацию об экспрессии мРНК для гена PTEN.

Чтобы определить, зависит ли выживание клеток меланомы с мутацией BRAFV600E под действием FGF2 от сигналинга FGFR, мы исследовали способность селективного ингибитора FGFR, Соединения Н, предотвращать FGF2-опосредованное выживание. Две клеточные линии, выживание которых стимулировали различными уровнями FGF2 (COLO 741 и SK-MEL-5, табл. 8-1), культивировали в среде, содержащей соединение формулы (I) и FGF2 в присутствии или отсутствии соединения Н и измеряли рост в реальном времени.

В соответствии с полученными ранее данными IC₅₀, соединение формулы (I) подавляет рост обеих клеточных линий и это подавление роста нивелировалось добавлением FGF2 (фиг. 3). В качестве одиночного средства, соединение Н не влияет на пролиферацию любой из клеточных линий (диаграмма А, не показана для SK-MEL-5), а сочетание с соединением формулы (I), при отсутствии FGF2, не способствует его активности как одиночного средства. В сочетании с соединением формулы (I), в присутствии FGF2, соединение Н проявляет антипролиферативные эффекты на уровнях, наблюдаемых в отсутствии FGF2. Эти результаты показывают, что FGF2-опосредованное выживание может быть предотвращено с помощью добавления селективного ингибитора FGFR - соединения Н.

Чтобы исследовать, может ли восстановленная активность MAPK или активированный сигналинг PIK3C лежать в основе FGF2-опосредованного выживания, эффекты FGF2 на сигналинг MAPK и PIK3C были оценены с помощью вестерн-блот анализа фосфорилированных MEK1/2 (MAP2K1/2), ERK1/2 (MAPK1/2) и AKT1/2/3. Как показано на фиг. 4, инкубация клеток COLO 741 и SK-MEL-5 с соединением Формулы (I) приводила к заметному подавлению сигналинга MAPK на 2 и 24 час, после добавления соединения, что оценивалось по снижению уровней фосфорилированных MEK и ERK. Уровни фосфорилированных AKT не изменялись в течение 2 ч, но незначительное снижение проявлялось после 24 ч в COLO 741 клетках. В противоположность этому, ни FGF2 ни соединение Н при добавлении в виде одиночных средств не влияли на сигналинг после 2 или 24 ч. При объединении FGF2 и Соединения Фор-

мулы (I), минимальные изменения в сигналинге по отношению только к соединению формулы (I) наблюдались через два часа после обработки (хотя, небольшое увеличение p-ERK наблюдалось в клетках SK-MEL-5), однако, уровни фосфорилированных MEK и ERK были существенно, хотя и не полностью, возобновлены через 24 ч. Наконец, добавление соединения Н к комбинации соединению формулы (I)/FGF2, полностью предотвращало FGF2-индуцированные изменения в сигналинге MAPK и PIK3C. Эти данные убедительно подтверждают подавление анти-пролиферативных эффектов ингибитора B-Raf FGF2, приводя к реактивации сигналинга MAPK, и указывают на то, что соединение Н способно полностью подавлять эти FGF2-индуцированные изменения в сигналинге.

Пример 6.

Задача: оценить эффективность комбинации соединения формулы (I) и ингибитора CDK 4, Соединение С, на модели первичной меланомы НМЕХ1906, которая устойчива к соединению формулы (I) при концентрации 5 мг/кг и выращивается в его присутствии (НМЕХ1906-R5).

Состав препарата: соединение С включает в свой состав 0,5% МЦ/0,5% Tween80 и соединению формулы (I) включает в свой состав 20% ПЭГ300/3% ТПГС.

Опухоли нарезаны/измельчены до получения суспензии, подобной клеточной линии (гомогенизированных опухолей). Было добавлено 7 мл матригеля и 1,5 мл забуференного раствора Хенкса (ЗРХ). Суспензию нагревали в ладони до тех пор, пока матригель имел плотную консистенцию, и имплантировали при помощи иглы 18G подкожно в правый бок самкам голых мышей.

Мыши были распределены на следующие группы на 18 день после имплантации со средним объемом опухоли 266 мм³ и средней массой тела 25 г.

Группы: 10 мышей/группа, РО путем, объем дозы 0,2 мл.

Группа 1: растворитель, 0 мг/кг bidx14.

Группа 2: соединение С, 250 мг/кг qdx21.

Группа 3: соединение формулы (I), 5 мг/кг bidx21.

Группа 4: соединение С 250 мг/кг qd x21+соединение.

Формулы (I) 5 мг/кг bid x21.

Результаты

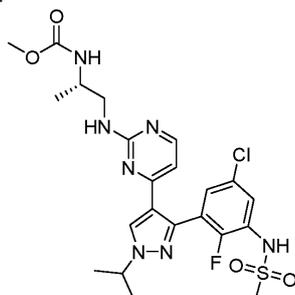
Группа	Среднее изменение объема опухоли по сравнению с контролем (о/к) (%)	Регрессия (%)	Среднее изменение объема опухоли (мм ³ ± СОС)	Среднее изменение веса тела (% ± СОС)	Выживаемость (Выжившие/Общее число)
1	100	-	2092 ± 154	4,2 ± 2,6	7/10*
2	4	-	86 ± 26	5,3 ± 1,4	10/10
3	39	-	807 ± 106	3,5 ± 1,1	10/10
4	-	64,32	-170 ± 45	7,1 ± 1,6	10/10

* - 3 мыши были умерщвлены в связи с наличием большой опухоли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента, страдающего от меланомы, характеризующейся мутацией V600 в BRAF, который включает:

(а) введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора B-Raf, который представляет собой соединение формулы (I):

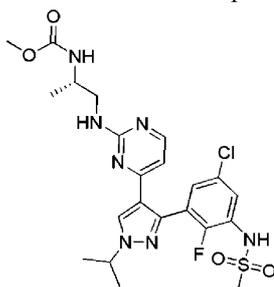


или его фармацевтически приемлемой соли, в качестве монотерапии, до момента, когда не проявляется прогрессирование заболевания;

(b) получение образца опухоли от пациента после прогрессирования заболевания и, на основании

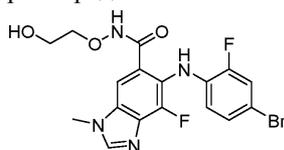
определения генетического изменения в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS, HRAS или EGFR в указанном образце опухоли,

(с) введение комбинированной медикаментозной терапии, включающей соединение формулы (I):



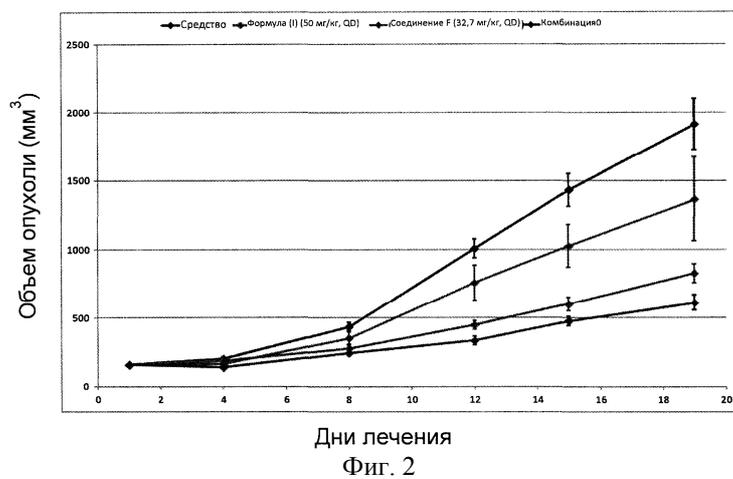
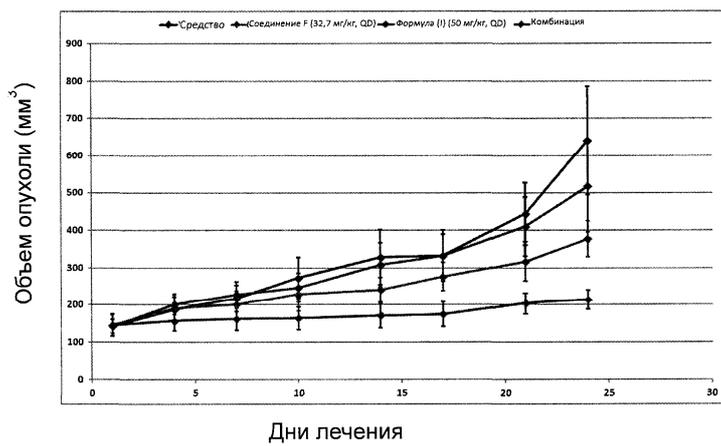
(I),

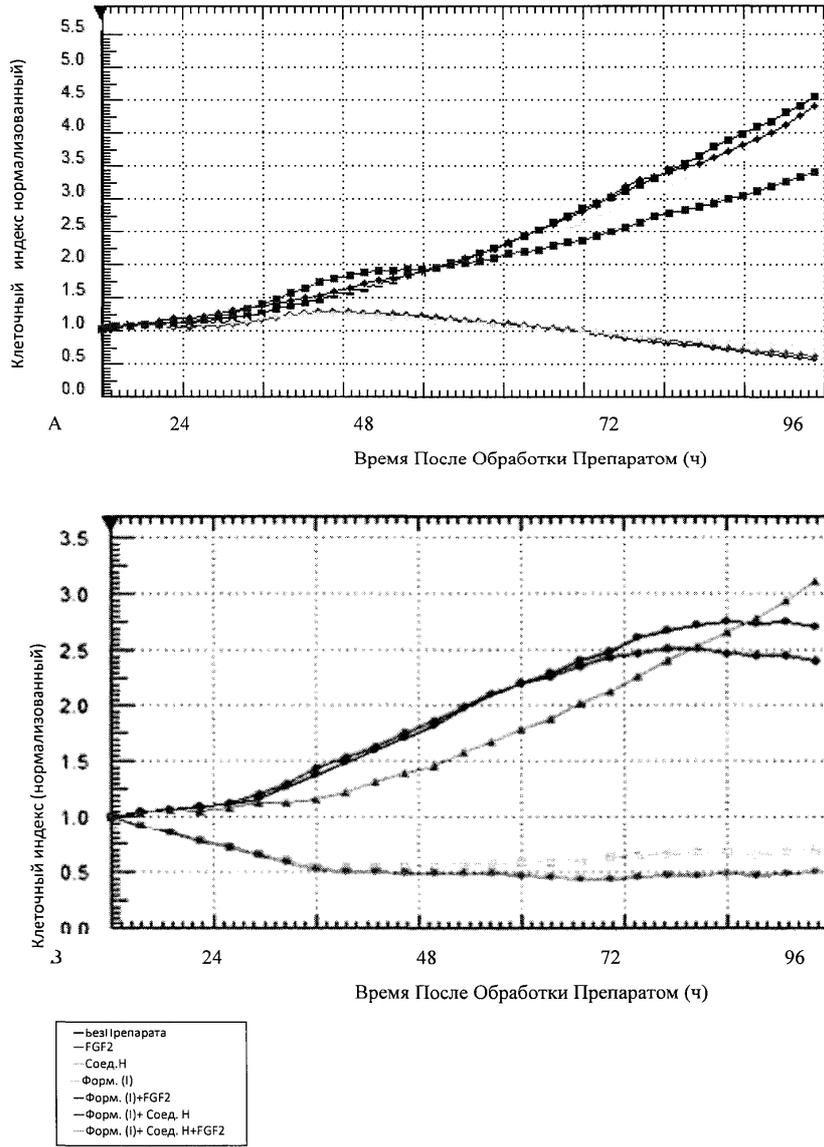
и ингибитор Мек 1/2, который представляет собой соединение В:



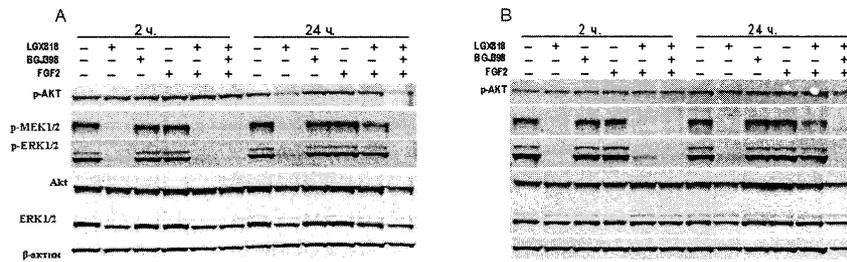
(Соединение В).

2. Способ по п.1, в котором ген представляет собой BRAF.
3. Способ по п.1, в котором генетические изменения могут быть результатом амплификации одного или нескольких генов, мутаций в одном или нескольких генах или потери активности одного или нескольких генов.
4. Способ по п.1, в котором генетические изменения могут быть результатом мутаций в одном или нескольких генах.
5. Способ по п.4, в котором один или несколько генов представляет собой BRAF.
6. Способ по п.5, в котором мутация представляет собой мутацию V600 в BRAF.
7. Способ по п.6, в котором мутация V600 в BRAF представляет собой мутацию V600E или мутацию V600K.
8. Способ по п.6, в котором мутация V600 в BRAF представляет собой мутацию V600E.
9. Способ по п.1, в котором прогрессирование заболевания оценивают с помощью критериев RECIST.
10. Способ по п.1, в котором ингибитор В-Raf на стадии (а) вводят непрерывно.
11. Способ по п.1, в котором ингибитор В-Raf на стадии (а) вводят прерывисто.
12. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) на стадии (с) вводят непрерывно.
13. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) на стадии (с) вводят прерывисто.
14. Способ по п.1, в котором ингибитор В-Raf на стадии (а) вводят перорально.
15. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) и соединение В на стадии (с) каждое вводят перорально.
16. Способ по п.1, в котором ингибитор В-Raf на стадии (а) вводят в дозе от 150 до 600 мг в день.
17. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) на стадии (с) вводят в дозе от 150 до 600 мг в день.
18. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) на стадии (с) вводят в дозе 450 мг в день.
19. Способ по п.1, в котором соединение В на стадии (с) вводят в дозе от 15 до 60 мг два раза в день.
20. Способ по п.19, в котором соединение В на стадии (с) вводят в дозе 45 мг два раза в день.
21. Способ по п.20, в котором две дозы соединения В вводят с интервалом в 12 ч.
22. Способ по п.1, в котором соединение формулы (I) и соединение В вводят в ходе 21-дневного цикла.
23. Способ по п.1, в котором меланома является локально прогрессирующей или метастатической меланомой.
24. Способ по п.1, в котором меланома является неоперабельной меланомой III стадии или метастатической меланомой III-IV стадии.
25. Способ по п.1, в котором до стадии (а) пациент ранее не принимал ингибитор BRAF.





Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2