

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040521**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.16

(21) Номер заявки
201990175

(22) Дата подачи заявки
2017.07.28

(51) Int. Cl. **A61K 31/635** (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИМЕТЕЛЬСТАТА И АВТ-199 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА, НАБОР И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЕЁ РЕАЛИЗАЦИИ, СПОСОБ IN VITRO ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА В КЛЕТКЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

(31) 62/370,018; 16197293.0; 62/422,738

(32) 2016.08.02; 2016.11.04; 2016.11.16

(33) US; EP; US

(43) 2019.08.30

(86) PCT/US2017/044348

(87) WO 2018/026646 2018.02.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕРОН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Хуан Фей, Расбелт Джошуа Дж., Ризо
Александра (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) UTE FISCHER ET AL.: "Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options", NATURE GENETICS., vol. 47, no. 9, 27 July 2015 (2015-07-27), pages 1020-1029, XP055361823, NEW YORK, US ISSN: 1061-4036, DOI: 10.1038/ng.3362, the whole document

DIANA ROMERO: "Haematological cancer: Promising results of BCL2 inhibition", NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY, vol. 12, no. 9, 11 August 2015 (2015-08-11), pages 504-504, XP055361723, NY, US ISSN: 1759-4774, DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.139, the whole document

M. A. SHAMMAS ET AL.: "Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo", LEUKEMIA, vol. 22, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 1410-1418, XP055036097, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2008.81, the whole document

WO-A1-2014088785

WO-A1-2014160071

WO-A2-2011017096

EBRAHIM ABDUL SHUKKUR ET AL.: "Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein", JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, SPRINGER INTERNATIONAL, BERLIN, DE, vol. 142, no. 9, 4 April 2016 (2016-04-04), pages 2013-2022, XP036025954, ISSN: 0171-5216, DOI: 10.1007/S00432-016-2144-1 [retrieved on 2016-04-04], the whole document

JOANA ROPIO ET AL.: "Telomerase Activation in Hematological Malignancies", GENES, vol. 7, no. 9, 7 September 2016 (2016-09-07), page 61, XP055361849, DOI: 10.3390/genes7090061, the whole document

(57) Предлагаются комбинированная терапия с применением иметельстата и АВТ-199 для лечения острого миелоидного лейкоза, набор и фармацевтическая композиция для ее реализации, способ in vitro индукции апоптоза в клетке острого миелоидного лейкоза.

B1**040521****040521****B1**

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/370018 (поданной 2 августа 2016 г.), европейской заявке на патент № 16197293.0 (поданной 4 ноября 2016 г.) и предварительной заявке США № 62/422738 (16 ноября 2016 г.), полное содержание каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит Перечень Последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII, и полностью включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 17 июля 2017 г., называется PRD3424WOPCT_SL.txt и имеет размер 2335 байт.

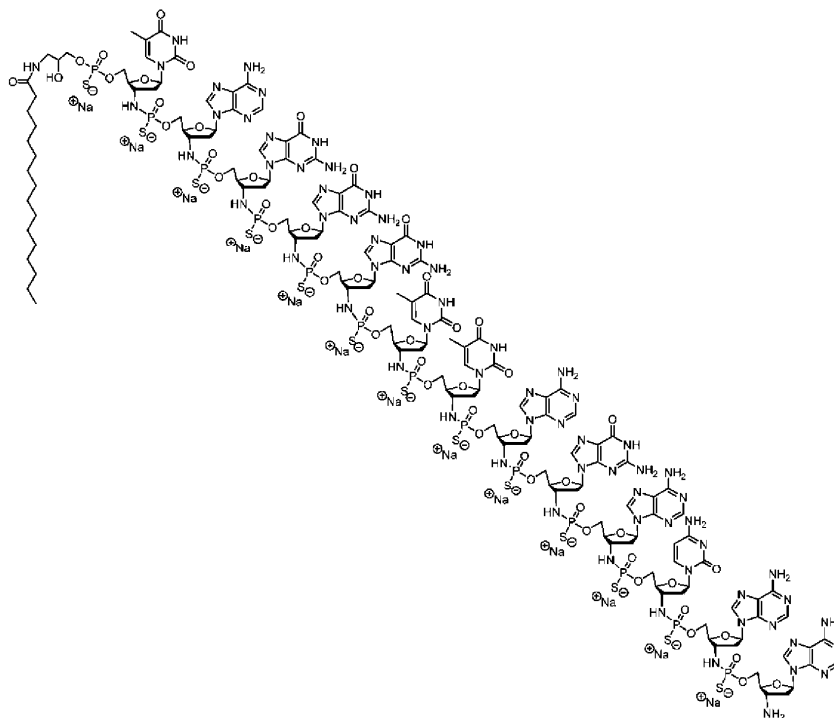
Область техники

Раскрытие изобретения, предложенное в данном документе, относится к лечению гематологических онкологических заболеваний с применением комбинации ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2.

Уровень техники

Пациенты с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) имеют ограниченные варианты лечения на момент постановки диагноза; лечение обычно происходит в форме химиотерапии, чтобы быстро уменьшить нагрузку лейкозных клеток. Процедуры инвазивного лейкофереза для изъятия большого количества лейкоцитов (нормальных и подверженных болезни) могут применяться параллельно с химиотерапией для временного снижения нагрузки опухолевых клеток. Индукционная фаза химиотерапии может быть успешной, но большинство здоровых клеток, находящихся в костном мозге пациента, также погибают, вызывая нарушение и требуя дополнительной облегчающей терапии для предотвращения инфекции и повышения количества лейкоцитов. Могут быть применены дополнительные раунды химиотерапии в попытке удержать пациентов в состоянии ремиссии; но рецидив является распространенным явлением.

Теломераза присутствует в более чем 90% опухолей всех типов онкологических заболеваний; и отсутствует в нормальных, здоровых тканях. Иметельстат натрия является первым в своем классе ингибитором теломеразы, который представляет собой ковалентно-липидированный 13-мерный олигонуклеотид (показан ниже), комплементарный области РНК-матрицы человеческой теломеразы (hTR). Иметельстат натрия не функционирует через анти-смысловой механизм и поэтому не имеет побочных эффектов, обычно наблюдаемых при таких методах лечения. Иметельстат натрия - это натриевая соль иметельстата (показан ниже):



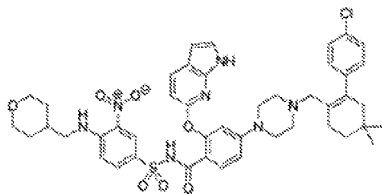
Иметельстат натрия

Если не указано иное или не ясно из контекста, отсылки ниже к иметельстату также включают в себя его соли. Как упоминалось выше, в частности, иметельстат натрия представляет собой натриевую соль иметельстата.

ABT-199/венитоклак (торговое наименование Venclexta) - это одобренный Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) ингибитор Bcl-2 для использования пациентами с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) с del17p, которые рецидивируют/трудно поддаются лечению. ABT-199 также известен как ABT 199, GDC0199, GDC-0199 или RG7601. Химическое название ABT-199: 4-[4-[[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогексен-1-ил]метил]пиперазин-1-ил]-N-[3-нитро-4-(оксан-4-илметиламино)фенил]сульфонил-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)-

си)бензамид (CAS № 1257044-40-8). Если не указано иное или не ясно из контекста, отсылки ниже к АВТ-199 также включают в себя его фармацевтически приемлимые соли. В частности, конкретно в примерах АВТ-199 использовали в депротонированной форме.

АВТ-199, показанный ниже в депротонированной форме, высоко специфичен к Bcl-2, в отличие от других ингибиторов первого поколения, которые демонстрируют аффинность к родственным членам семейства Bcl и вызывают более сильные побочные эффекты. Ингибирование Bcl-2 блокирует проапоптотические сигналы, вызванные повреждением или аномалиями в клеточной ДНК, и в конечном итоге приводит к запрограммированной клеточной гибели в обработанных клетках через каспазный каскад, и апоптоз через митохондриальный сигнальный путь.



АВТ-199 (показан в депротонированной форме)

Уровень техники

Комбинированное дозирование иметельстатом натрия и АВТ-199 клеток ОМЛ обеспечивает принципиально новое лечение гематологических раковых заболеваний и, в частности, ОМЛ. Иметельстат натрия в настоящее время клинически исследуется при миелоидном фиброзе (МФ) и миелодиспластическом синдроме (МДС). АВТ-199 одобрен FDA для ХЛЛ (хронического лимфоцитарного лейкоза) и также исследуется при ОМЛ.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения острого миелоидного лейкоза, включающий в себя введение иметельстата и АВТ-199 субъекту с острым миелоидным лейкозом. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия. Иметельстат или иметельстат натрия может быть введен в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, причем каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; или (с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели. В одном из вариантов осуществления способа АВТ-199 вводят в дозе (а) 50-400 мг АВТ-199 ежедневно; (b) 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно; или (с) 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно. В еще одном варианте осуществления способа введение АВТ-199 осуществляют за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат.

Другие варианты осуществления изобретения представляют собой применение иметельстата или иметельстата натрия для лечения острого миелоидного лейкоза у пациента, проходящего лечение АВТ-199 или его фармацевтически приемлемой солью, а также применение АВТ-199 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения острого миелоидного лейкоза у пациента, проходящего лечение иметельстатом или иметельстатом натрия. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия. Иметельстат могут вводить, например, в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, при этом каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; или с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели. В одном из вариантов осуществления АВТ-199 предназначен для введения в дозе: (а) 50-400 мг АВТ-199 ежедневно; (b) 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно; или (с) 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно. В другом варианте осуществления упомянутых применений введение АВТ-199 возможно за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение комбинации, содержащей иметельстат и АВТ-199, для лечения у пациента острого миелоидного лейкоза. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия. В одном из вариантов осуществления иметельстат вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, при этом каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; или с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели. В другом варианте осуществления АВТ-199 предназначен для введения в дозе: (а) 50-400 мг АВТ-199 ежедневно; (b) 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно; или (с) 25 мг АВТ-

199 на 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежесуточно. В другом варианте осуществления введение АВТ-199 возможно за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат. Комбинация может представлять собой фармацевтическую композицию.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение иметельстата и АВТ-199 при приготовлении лекарственного средства для лечения острого миелоидного лейкоза. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия. Комбинация иметельстата и АВТ-199 может индуцировать апоптоз клеток острого миелоидного лейкоза.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение иметельстата натрия для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающее в себя введение иметельстата натрия и АВТ-199 в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение АВТ-199 для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающее в себя введение комбинации АВТ-199 и иметельстата натрия субъекту, нуждающемуся в этом.

Иметельстат натрия может быть предназначен для введения в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия один раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия один раз в неделю в течение четырех недель; (с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата натрия один раз в три недели или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата натрия один раз в четыре недели. АВТ-199 может быть предназначен для введения в дозе: (а) около 50-400 мг АВТ-199 ежесуточно; (b) около 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 800 мг на 6-е сутки и после этого ежесуточно или (с) около 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 400 мг на 5-е сутки и после этого ежесуточно. Введение АВТ-199 могут осуществлять за одни сутки до, через одни сутки после, или в те же сутки, когда вводят иметельстат натрия.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ *in vitro* индукции апоптоза в клетке острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающий приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством иметельстата; и приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством АВТ-199. В некоторых вариантах осуществления этого способа иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой набор для реализации описанных выше способов или применений, содержащий: (а) дозу иметельстата в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза клеток острого миелоидного лейкоза; (b) дозу АВТ-199 или его фармацевтически приемлемой соли в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза клеток острого миелоидного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления этого набора иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для реализации вышеупомянутых способов и применений, содержащей иметельстат и АВТ-199.

В одном из вариантов осуществления упомянутой фармацевтической композиции иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

В другом варианте осуществления упомянутая фармацевтическая композиция предназначена для лечения острого миелоидного лейкоза.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А и 1В демонстрируют результаты обработки клеток KG-1 иметельстатом натрия и/или АВТ-199 в течение 48 часов. Фиг. 1А демонстрирует точечные графики клеток KG-1 после 48-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 1В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток KG-1 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 2А и 2В демонстрируют результаты обработки клеток KG-1 иметельстатом натрия и/или АВТ-199 в течение 96 ч. Фиг. 2А демонстрирует точечные графики клеток KG-1 после 96-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 2В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток KG-1 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 3А и 3В демонстрируют эффекты обработки клеток KG-1 неполностью комплементарными или некомплементарными олигонуклеотидами и АВТ-199 в течение 48 ч. Фиг. 3А демонстрирует точечные графики клеток KG-1 после 48-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 3В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток KG-1 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов. Некомп. относится к некомплементарному контрольному олигонуклеотиду. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 4А и 4В демонстрируют эффекты обработки клеток KG-1 неполностью комплементарными или некомплементарными олигонуклеотидами и АВТ-199 в течение 96 ч. Фиг. 4А демонстрирует точечные графики клеток KG-1 после 96-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 4В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток KG-1 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов. Некомп. относится к некомплементарному контрольному олигонуклеотиду. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 5А и 5В демонстрируют эффекты обработки клеток MOLM-13 иметельстатом натрия и/или АВТ-199 в течение 48 ч. Фиг. 5А демонстрирует точечные графики клеток MOLM-13 после 48-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 5В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 6А и 6В демонстрируют эффекты обработки клеток MOLM-13 иметельстатом натрия и/или АВТ-199 в течение 48 ч. Фиг. 6А демонстрирует точечные графики клеток MOLM-13 после 96-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 6В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 7А и 7В демонстрируют эффекты обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольного олигонуклеотида в течение 48 ч. Фиг. 7А демонстрирует точечные графики клеток MOLM-13 после 48-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 7В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов. Некомп. относится к некомплементарному контрольному олигонуклеотиду. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 8А и 8В демонстрируют эффекты обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов в течение 96 ч. Фиг. 8А демонстрирует точечные графики клеток MOLM-13 после 96-часовой обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов, и окрашивание аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 8В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольных олигонуклеотидов. Некомп. относится к некомплементарному контрольному олигонуклеотиду. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 9 демонстрирует уровни транскрипции hTERT, измеренные с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР-РВ) после обработки иметельстатом натрия, АВТ-199 или их комбинацией через 48 и 96 ч в клетках KG-1 или MOLM-13.

Фиг. 10 демонстрирует уровни активности фермента теломеразы, измеренные с помощью кПЦР-РВ TRAP (протокол амплификации теломерных повторов) после обработки иметельстатом натрия, АВТ-199 или комбинацией через 48 и 96 ч в клетках KG-1 или MOLM-13.

Фиг. 11 демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 12А и 12В демонстрируют % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199, контрольных неполностью комплементарного олигонуклеотида и некомплементарного олигонуклеотида. Фиг. 12А демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольного неполностью комплементарного олигонуклеотида "Неполнокомп.". Фиг. 12В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольного некомплементарного олигонуклеотида "Некомп.". Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 13 демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия. Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 14А и 14В демонстрируют % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 48-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199, контрольного неполностью комплементарного олигонуклеотида и некомплементарного олигонуклеотида. Фиг. 14А

демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольного неполностью комплементарного олигонуклеотида "Неполнокомп.". Фиг. 14В демонстрирует график % апоптотических клеток в зависимости от концентрации соединения для 96-часовой обработки клеток MOLM-13 различными концентрациями АВТ-199 и/или контрольного некомплементарного олигонуклеотида "Некомп.". Апоптотические клетки дважды помечены аннексином V и йодидом пропидия.

Фиг. 15А-15D демонстрируют средние ответы четырех образцов МКПК (моноклеарных клеток периферической крови), полученных из цельной крови пациентов с ОМЛ и подвергнутых *ex vivo* обработке АВТ-199 и/или иметельстатом натрия в различных концентрациях в течение 16 и 40 ч, и проанализированных на жизнеспособность клеток методом проточной цитометрии с окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия. Фиг. 15А и 15В демонстрируют графики % жизнеспособных клеток в зависимости от концентрации соединения для обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия в течение 16 ч МКПК, очищенных фиколлом из цельной крови пациентов с ОМЛ. Фиг. 15А демонстрирует результаты для CD45⁺ лейкоцитов. Фиг. 15В демонстрирует результаты для лейкозных стволовых клеток CD45⁺/CD34⁺. Фиг. 15С и 15D демонстрируют графики % жизнеспособных клеток в зависимости от концентрации соединения для обработки различными концентрациями АВТ-199 и/или иметельстата натрия в течение 40 ч МКПК, очищенных фиколлом из цельной крови пациентов с ОМЛ. Фиг. 15С демонстрирует результаты для CD45⁺ лейкоцитов. Фиг. 15D демонстрирует результаты для лейкозных стволовых клеток CD45⁺/CD34⁺. На фиг. 15А-15D, планки погрешностей представляют среднеквадратические отклонения. Жизнеспособные клетки, оставшиеся после обработки, не помечены аннексином V или йодидом пропидия.

Фиг. 16 демонстрирует противоопухолевую эффективность и преимущество в выживаемости *in vivo* иметельстата натрия или АВТ-1 в виде монотерапии, или агентов в комбинации, в мышинной модели. Мышей инокулировали клетками MOLM-13 (модель с диссеминированием) и обрабатывали носителем, иметельстатом натрия и/или АВТ-199, или неполностью комплементарным олигонуклеотидным контролем плюс АВТ-199. Наблюдали выживаемость мышей (n = 10 мышей/группа в начале) после обработки. В частности, фиг. 16 демонстрирует процент выживания мышей как функцию от суток после имплантации опухолевых клеток. Мышей обрабатывали в течение 31 суток: (i) носителями (ММ+ПЭГ400/Phosal50/ЕТОН); (ii) иметельстатом натрия (30 мг/кг), (iii) АВТ-199 (100 мг/кг), (iv) ММ (неполностью комплементарный олиго) (30 мг/кг) и АВТ-199 (100 мг/кг) и (v) иметельстатом натрия (30 мг/кг) и АВТ-199 (100 мг/кг).

Фиг. 17А и 17В демонстрируют апоптотические популяции через 96 ч после обработки однократной дозой иметельстата натрия для клеток MOLM-13 и HL-60. Фиг. 17А демонстрирует апоптотическую популяцию (двойное мечение) через 96 ч после обработки однократной дозой иметельстата натрия для MOLM-13. Фиг. 17В демонстрирует апоптотическую популяцию (двойное мечение) через 96 ч после обработки однократной дозой иметельстата натрия для клеточной линии ОМЛ HL-60.

Подробное описание сущности изобретения

Нижеследующее подробное описание изобретения будет лучше понято при прочтении в сочетании с прилагаемыми фигурами. Фигуры предоставлены для иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Однако изобретение не ограничивается указанными точными компоновками, примерами и инструментами. Для ясности раскрытия, а не в качестве ограничения, подробное описание изобретения разделено на подразделы, которые описывают или иллюстрируют определенные признаки, варианты осуществления или применения данного изобретения.

Согласно изобретению предложены способы лечения гематологических онкологических заболеваний с помощью комбинации ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2. Устойчивые к лекарствам клеточные популяции могут быть причиной неполного ответа на лечение или рецидива заболевания. Согласно данному изобретению предложена комбинация ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2, которые работают синергически для индукции более высоких уровней апоптоза в клетках ОМЛ, чем каждое лекарственное средство может индуцировать отдельно. Согласно данному изобретению предложен способ индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке, включающий приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора теломеразы и терапевтически эффективным количеством ингибитора Bcl-2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В некоторых вариантах осуществления, гематологическое онкологическое заболевание представляет собой ОМЛ.

В некоторых случаях комбинация обеспечивает усиленный ингибирующий эффект по отношению к каждому компоненту в отдельности; в некоторых случаях комбинация обеспечивает сверхаддитивный или синергетический эффект относительно комбинированных или аддитивных эффектов компонентов.

В некоторых вариантах осуществления, способ представляет собой способ индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке. Способ данного изобретения может включать в себя приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора теломеразы и приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора Bcl-2. В некото-

рых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. Приведение в контакт клетки с ингибитором теломеразы может быть выполнено до, во время и/или после приведения в контакт клетки с ингибитором Bcl-2. Приведение в контакт клетки с ингибитором теломеразы и ингибитором Bcl-2 может быть выполнено одновременно или последовательно.

В одном варианте осуществления, ингибитор теломеразы представляет собой олигонуклеотид с ингибирующей теломеразу активностью, в частности олигонуклеотид, как определено в WO 2005/023994 и/или WO 2014/088785, которые оба включены в данный документ посредством ссылки.

В целом, как правило, могут быть применены различные комбинации ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2, применяемые либо последовательно, либо одновременно. Для многократного дозирования два агента могут непосредственно чередоваться, или две или большее количество доз одного агента могут чередоваться, например, с одной дозой другого агента. Одновременное введение обоих агентов может также сменяться или иным образом чередоваться с дозами отдельных агентов. В некоторых случаях время между дозировками может составлять от около 1-6 до около 6-12 ч, до около 12-24 ч, до около 1-2 суток, до около 1-2 недель и дольше после начала лечения. Во время курса лечения может быть пересмотрена необходимость полностью выполнять запланированное дозирование.

Термин "апоптоз" относится к процессу запрограммированной гибели клеток с сопровождающими его морфологическими изменениями и потерей жизнеспособности клеток. В одном варианте осуществления способ индукции апоптоза обеспечивает способ лечения неопластического нарушения в организме позвоночного.

В контексте данного способа термин "индуцирование" означает прямую или косвенную причинно-следственную связь. Таким образом, наличие и/или поддержание определенного режима вызывает или приводит к индуцированному результату.

Как применяется в данном документе, термин "около" применительно к измеряемому значению, такому как количество, временной промежуток, и тому подобное, подразумевает, что он охватывает отклонения от $\pm 20\%$ до $\pm 0,1\%$, предпочтительно $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ указанного значения, поскольку такие отклонения являются подходящими для выполнения раскрытых способов.

Как применяется всюду "ОМЛ" относится к острому миелоидному лейкозу.

А. Лечение

Как применяется в данном документе и хорошо известно в данной области техники, "лечение" представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей данного изобретения полезные или желательные клинические результаты включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ослабление или улучшение одного или нескольких симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, предотвращение разрастания заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или не обнаруживаемую. "Лечение" также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится.

Согласно данному изобретению предложено лечение (гематологических онкологических заболеваний, таких как острый миелоидный лейкоз), включающее в себя комбинирование введения ингибитора теломеразы иметельстата натрия с введением ингибитора Bcl-2 АВТ-199. Способ лечения согласно изобретению может быть более эффективным и вызывать больший отклик на лечение у пациентов с ОМЛ, чем при применении каждого лекарства по отдельности. В одном варианте осуществления, способ лечения включает в себя введение ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2 в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении гематологического онкологического заболевания. В другом варианте осуществления гематологическое онкологическое заболевание представляет собой ОМЛ. В другом варианте осуществления, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия. В другом варианте осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199.

В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора теломеразы, вводимая субъекту, представляет собой количество, достаточное для лечения заболевания, когда такое количество ингибитора теломеразы применяется отдельно. В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора теломеразы, вводимая субъекту, является меньшей, чем количество, достаточное для лечения заболевания, когда ингибитор теломеразы применяется отдельно. В одном варианте осуществления дозу ингибитора теломеразы уменьшают при применении в комбинации с АВТ-199 при лечении субъекта, у которого был диагностирован ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия. В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора Bcl-2, вводимая субъекту, представляет собой количество, достаточное для лечения заболевания, когда ингибитор Bcl-2 применяется отдельно. В

некоторых вариантах осуществления доза ингибитора Bcl-2, вводимая субъекту, является меньшей, чем количество, достаточное для лечения заболевания, когда ингибитор Bcl-2 применяется отдельно. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой ABT-199. В другом варианте осуществления дозу ингибитора Bcl-2 уменьшают при использовании в комбинации с иметельстатом при лечении субъекта, у которого был диагностирован ОМЛ. В еще одном варианте осуществления дозы иметельстата и ABT-199 уменьшают при использовании в комбинации при лечении субъекта, у которого диагностирован ОМЛ.

В другом варианте осуществления продолжительность лечения ингибитором теломеразы уменьшают при использовании в комбинации с ингибитором Bcl-2 при лечении субъекта, который имеет гематологическое онкологическое заболевание. В другом варианте осуществления продолжительность лечения с помощью иметельстата уменьшают при использовании в комбинации с ABT-199 при лечении субъекта с гематологическим онкологическим заболеванием. В другом варианте осуществления продолжительность лечения с помощью ABT-199 уменьшают при использовании в комбинации с иметельстатом при лечении субъекта, у которого диагностировано гематологическое онкологическое заболевание. В другом варианте осуществления продолжительность лечения обоими иметельстатом и ABT-199 уменьшают при использовании в комбинации при лечении субъекта, у которого диагностировано гематологическое онкологическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления гематологическое онкологическое заболевание представляет собой ОМЛ.

Описанные в данном документе комбинации лекарств могут быть введены субъекту в виде композиции, содержащей оба лекарства, или по отдельности. Описанные в данном документе комбинации лекарств могут быть введены в виде комбинированной лекарственной композиции, например, путем внутривенного введения, или отдельно.

В. Гематологические онкологические заболевания

Способы согласно данному изобретению могут быть применены для лечения любого подходящего гематологического злокачественного новообразования. Гематологические злокачественные новообразования - это формы рака, которые начинаются с клеток кроветворной ткани, такой как костный мозг, или с клеток иммунной системы. Примерами гематологических онкологических заболеваний являются острые и хронические лейкомии, лимфомы, множественная миелома и миелодиспластические синдромы. В некоторых случаях гематологическое злокачественное новообразование называют гематологическим онкологическим заболеванием. Миелопролиферативные новообразования, или МПН, представляют собой гематологические новообразования, которые возникают из неопластических кроветворных миелоидных клеток-предшественниц в костном мозге, таких как клетки-предшественницы эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов. Пролиферация неопластических клеток-предшественниц приводит к перепроизводству любой комбинации лейкоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов, в зависимости от заболевания. Эти перепроизводимые клетки также могут быть ненормальными, что приводит к дополнительным клиническим осложнениям. Существуют различные виды хронических миелопролиферативных заболеваний. В миелопролиферативные новообразования включают идиопатическую тромбоцитемию, истинную полицитемию, хронический миелогенный лейкоз, миелофиброз, хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и острый миелогенный лейкоз. Миелодиспластический синдром (МДС) - это группа симптомов, которая включает рак крови и костного мозга. МДС включает в себя, но не ограничивается лишь этими: рефрактерную анемию, рефрактерную анемию с избытком бластных клеток, рефрактерную цитопению с дисплазией разных типов клеток и хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХМЛ).

Гематологические онкологические заболевания, представляющие интерес, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: ОМЛ, идиопатическую тромбоцитемию, истинную полицитемию, первичный миелофиброз, системный мастоцитоз, хронический миелоидный лейкоз; хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную цитопению с дисплазией разных типов клеток, рефрактерную анемию 1-го типа с избытком бластных клеток, рефрактерную анемию 2-го типа с избытком бластных клеток, миелодиспластический синдром (МДС) с обнаруженной делецией (5q), неклассифицируемый МДС, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХМЛ), атипичный хронический миелолейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, миелопролиферативные/миелодиспластические синдромы неклассифицируемые, В-лимфобластный лейкоз/лимфому, Т-лимфобластный лейкоз/лимфому, диффузную крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную среднестенную В-клеточную лимфому, лимфомы/лейкемии Беркитта, фолликулярную лимфому, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-лимфоцитарный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмоцитарную лимфому/макроглобулинемию Вальденстрема, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы краевой зоны, посттрансплантационные лимфопролиферативные нарушения, ВИЧ-ассоциированные лимфомы, первичную выпотную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную кожную В-лимфоцитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммопатию неизвестного значения, вялотекущую множественную миелому, и солитарные плазмцитомы (солитарную костную и экстрамедуллярную).

Некоторые схемы лечения согласно данному изобретению особенно подходят для лечения ОМЛ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субъект, которому вводят лекарство, имеет ОМЛ. Среди ОМЛ, применяя способы, раскрытые в данном документе, например путем введения иметельстата в комбинации с АВТ-199, можно лечить резистентные к химиотерапии ОМЛ, такие как ОМЛ, не поддающиеся лечению цитарабином в комбинации с даунорубицином или идарубицином. Ответ ОМЛ на лечение известен в данной области техники. Пример оценки ответа ОМЛ показан в табл. 1.

Таблица 1. Оценки ответа ОМЛ

Оценки ответа ОМЛ	
Категория	Определение
Полный ответ (ПО) ¹	Бластные клетки костного <5%; отсутствие бластных клеток с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярной болезни; абсолютное количество нейтрофилов $>1,0 \times 10^9/\text{л}$ (1000/мкл); количество тромбоцитов $>100 \times 10^9/\text{л}$ (100000/мкл); независимость от вливания эритроцитов
ПО с неполным выздоровлением (ПОнв) ²	Все критерии ПО, за исключением остаточной нейтропении ($<1,0 \times 10^9/\text{л}$ [1000/мкл]) или тромбоцитопении ($<100 \times 10^9/\text{л}$ [100000/мкл])
Морфологическое состояние без лейкемии ³	Бластные клетки костного мозга <5%; отсутствие бластных клеток с тельцами Ауэра; отсутствие экстрамедуллярной болезни; гематологическое восстановление не требуется
Частичный ответ (ЧО)	Относится только к фазе 1 и 2 клинических испытаний; все гематологические критерии ПО; уменьшение процента бластных клеток костного мозга до 5-25%; и уменьшение процента бластных клеток костного мозга перед лечением по меньшей мере на 50%
Цитогенетический ПО (ПОц) ⁴	Возврат к нормальному кариотипу во время морфологического ПО (или ПОнв) в случаях с аномальным кариотипом во время диагностики; на основе оценки 20 метафазных клеток из костного мозга
Молекулярный ПО (ПОм) ⁵	Нет стандартного определения; зависит от молекулярной мишени
Рецидив ⁶	Бластные клетки костного мозга $\geq 5\%$; или повторное появление бластных клеток в крови; или развитие экстрамедуллярной болезни
Провал лечения ⁷	$>25\%$ абсолютное увеличение количества бластных клеток в костном мозге по сравнению с исходным уровнем до данного оценивания (например, от 20% до 46%) для пунктата костного мозга (или биопсии в случае сухой пункции)

Стабильная болезнь ⁸	Не соответствует полному или частичному ответу и не имеет доказательств неэффективности лечения.
Определения критериев ответа основаны, прежде всего, на критериях, данных Чесоном в 1990 году. ¹ Все критерии должны быть соблюдены; оценка костного мозга должна основываться на подсчете 200 содержащих ядра клеток в пунтате со спикулами; если есть сомнения, рассмотрите повторное исследование через 5-7 суток; оценка проточной цитометрией может помочь различить хронический лейкоз и регенерирующий нормальный костный мозг; биопсия костного мозга должна выполняться в случаях сухой пункции, или если не было получено спикул; минимальная продолжительность ответа не требуется. ² Критерий ПОНв имеет значение в протоколах, использующих стратегии усиленной индукции или двойной индукции, в которых гематологическое восстановление не предполагается, но интенсивная терапия будет продолжена. В таких протоколах ПО может даже не достигаться в цикле всего плана лечения. В этих случаях общий коэффициент ответа должен включать в себя пациентов с ПО и ПОНв. Некоторые пациенты могут не достичь полного гематологического восстановления после более длительного времени наблюдения. ³ Эта категория может быть полезна при клинической разработке новых препаратов в рамках фазы I клинических испытаний, в которых может быть достигнуто временное состояние без морфологического лейкоза во время ранней оценки ответа. ⁴ Четыре исследования показали, что неспособность перейти к нормальному кариотипу во время ПО предсказывает плохой результат. ⁵ В качестве примера, при ОМЛ CBF (кор-связывающий фактор) низкий уровень ПЦР-положительности может быть обнаружен у пациентов даже при долгосрочном ответе. При нормализации до 104 копий ABL1 в соответствии со стандартизированными критериями, уровни транскриптов ниже 12-10 копий, по-видимому, являются прогностическими для долгосрочного ответа. ⁶ В случаях с низким процентом бластных клеток (5-10%), должен быть выполнен повторный забор костного мозга, чтобы подтвердить рецидив. Появление новых диспластических изменений следует тщательно контролировать на предмет возникновения рецидива. У пациента, которого недавно лечили, дисплазия или кратковременное увеличение количества бластных клеток может отражать эффект химиотерапии и восстановление гемопоэза. Должна быть проанализирована цитогенетика, чтобы отличить истинный рецидив от связанных с терапией МДС/ОМЛ	

Описанные в данном документе комбинации лекарственных средств являются подходящими для применения при лечении любого из заболеваний или нарушений, упомянутых в данном документе, включая гематологическое онкологическое заболевание (или его подтипы). Лекарства могут быть введены одновременно или последовательно.

Описанные в данном документе комбинации лекарств пригодны для применения при индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке. Лекарства могут быть введены одновременно или последовательно.

Также будет понятно, что композиции, описанные в данном документе, являются подходящими для применения при лечении любого из заболеваний или нарушений, упомянутых в данном документе, включая гематологическое онкологическое заболевание (или его подтипы).

С. Субъект

Субъект представляет собой млекопитающее, нуждающееся в лечении рака. Как правило, субъект является пациентом-человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, субъектом может быть не относящееся к человеку млекопитающее, такое как примат, отличный от человека, животная модель (например, животные, такие как мыши и крысы, используемые при скрининге, характеристике и оценке лекарств) и другие млекопитающие. Как применяется в данном документе, термины пациент,

субъект и индивид применяются взаимозаменяемо.

D. Противораковые агенты

В следующем разделе описаны лекарственные средства, применяемые в различных вариантах осуществления изобретения. Так как эти препараты хорошо известны, мы приводим только краткие обсуждения. Публикации, процитированные в данном разделе, предназначены для иллюстрации аспектов лекарственного средства для пользы практикующего врача; однако ссылка на конкретную публикацию в данном разделе или где-либо еще в данном раскрытии изобретения не предназначена для ограничения данного изобретения в каком-либо отношении, в том числе в отношении доз, комбинаций и показаний.

1. Ингибиторы теломеразы

Примеры ингибиторов теломеразы включают в себя, без ограничения, иметельстат, в частности иметельстат натрия. В некоторых случаях один или больше чем один ингибитор теломеразы (например, два или три ингибитора теломеразы) могут быть введены млекопитающему для лечения гематологического злокачественного новообразования.

Иметельстат натрия - это натриевая соль иметельстата, представляющая собой синтетический липид-конъюгированный 13-мерный олигонуклеотид N3'[^]P5'-тио-фосфорамидат. Химическое название иметельстата натрия: ДНК, d(3'-амино-3'-деокси-Р-тио) (Т-А-Г-Г-Г-Т-Т-А-Г-А-С-А-А), 5'-[O-[2-гидрокси-3-(гексадеканиламино)пропил]фосфоротиоат], натриевая соль (1:13) (SEQ ID NO: 1). Иметельстат и иметельстат натрия могут быть синтезированы, приготовлены, или получены, как описано где-нибудь еще (Asai et al, Cancer Res., 63(14):3931- 3939 (2003), Herbert et al., Oncogene, 24: 5262-5268 (2005) и Gryaznov, Chem. Biodivers., 7:477-493 (2010)).

Иметельстат и иметельстат натрия нацелены на РНК-матрицу теломеразы и, как было показано, ингибируют активность теломеразы и пролиферацию клеток в различных линиях раковых клеток и опухолевых ксенотрансплантатах у мышей. Исследования фазы 1 с участием пациентов с раком молочной железы, немелкоклеточным раком легкого и другими солидными опухолями, множественной миеломой или хроническим лимфоцитарным лейкозом предоставили информацию о фармакокинетике и фармакодинамике лекарственного средства, и помогли обосновать 9,4 мг на килограмм массы тела (предоставляется как 2-часовая внутривенная инфузия). Последующее исследование фазы 2 с участием пациентов с идиопатической тромбоцитомией показало снижение активности тромбоцитов, сопровождающееся значительным снижением нагрузки (доли) мутантных аллелей JAK2 V617F и CALR. Иметельстат натрия обычно вводят внутривенно; предполагается, что при практическом применении данного изобретения также могут быть использованы другие пути введения, такие как интратекальное введение, внутриопухолевая инъекция, пероральное введение и другие. Натрия иметельстат может быть введен в дозах, сравнимых с теми, которые обычно используются в клинике. В предпочтительных вариантах осуществления, иметельстат натрия вводят, как описано в другом месте данного документа.

Конкретный вариант осуществления соответствует любому из других вариантов осуществления, в которых иметельстат ограничен до иметельстата натрия.

2. АВТ-199 - ингибитор Bcl-2 АВТ-199 (венитоклакс) представляет собой первый в своем классе селективный пероральный ингибитор BCL-2, щадящий тромбоциты (фиг. 1B). Он показал субнанолярную аффинность к BCL-2 ($K_i < 0,010$ нМ) с противоопухолевой активностью в отношении неходжкинской лимфомы (НХЛ) и ХЛЛ in vitro. In vivo ксенотрансплантатные исследования на мышах показали активность против агрессивных (Мус+) лимфом, а также острого лейкоза. В фазе Ia испытания АВТ-199 в R/R НХЛ применяли непрерывную суточную дозу 200-900 мг. Единичную дозу вводили на 7-е сутки с последующим вводным периодом с постепенным повышением титра в течение 2-3 недель. Монотерапия АВТ-199 была также изучена в открытом, многоцентровом исследовании фазы 2 у пациентов с высоким риском R/R ОМЛ и у не проходивших лечение пациентов, которые были непригодны для интенсивной химиотерапии. Исследование допускало увеличение дозы у одного и того же пациента, когда пациент получал 20 мг АВТ-199 в неделю (Нед.) 1 сутки 1. Было введено ежесуточное увеличение для достижения конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и затем ежесуточно. Такие пациенты без полного ответа (ПО) или ПО с неполным гематологическим восстановлением (ПОНв) до первого запланированного оценивания (конец Нед. 4) смогли увеличить дозу до 1200 мг. Рекомендуемая доза АВТ-199 фазы 2 в комбинации с ритуксимабом составляет 400 мг в сутки.

E. Фармацевтические композиции

Данное изобретение также рассматривает фармацевтические композиции, содержащие ингибитор теломеразы (например, иметельстат, в частности, иметельстат натрия) и ингибитор Bcl-2 (например, АВТ-199). В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит иметельстат, в частности иметельстат натрия, и АВТ-199. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит иметельстат, в частности иметельстат натрия и АВТ-199. Описанные в данном документе комбинации лекарственных средств могут быть введены субъекту в виде композиции, содержащей оба лекарственных средства.

Носитель или разбавитель должны быть "приемлемыми" в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами композиции и не вредны для их реципиентов.

Для простоты введения комбинации лекарственных средств, описанные в данном документе, могут

быть приготовлены в виде различных фармацевтических форм для целей введения. Комбинации лекарственных средств, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в виде различных фармацевтических форм для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть указаны все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств.

Для приготовления фармацевтических композиций согласно данному изобретению эффективное количество комбинации лекарственных средств, описанных в данном документе, комбинируют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, причем этот носитель может принимать самые разные формы в зависимости от формы препарата, желаемой для введения. Данные фармацевтические композиции желательны в форме единицы дозирования, подходящей, в частности, для перорального, ректального, чрескожного введения, парентеральной инъекции или путем ингаляции. В некоторых случаях введение может осуществляться внутривенной инъекцией. Например, при приготовлении композиций в оральной дозированной форме могут быть применены любые обычные фармацевтические среды, такие как, например, вода, гликоли, масла, спирты и тому подобное в случае жидких препаратов для перорального применения, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и тому подобное, в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Из-за легкости их введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее выгодные формы единиц дозирования для перорального применения, и в этом случае, очевидно, используются твердые фармацевтические носители. Для парентеральных композиций носитель обычно содержит стерильную воду, по меньшей мере в большей части, хотя могут быть включены и другие ингредиенты, например, для улучшения растворимости. Например, могут быть приготовлены инъекционные растворы, в которых носитель включает в себя физиологический раствор, раствор глюкозы или смесь физиологического раствора и раствора глюкозы. Например, могут быть приготовлены инъекционные растворы, в которых носитель включает в себя физиологический раствор, раствор глюкозы, или смесь физиологического раствора и раствора глюкозы. Инъекционные растворы, содержащие комбинацию лекарственных средств, описанных в данном документе, могут быть приготовлены в виде масла для пролонгированного действия. Подходящими маслами для этой цели являются, например, арахисовое масло, кунжутное масло, хлопковое масло, кукурузное масло, соевое масло, синтетические сложные глицериновые эфиры длинноцепочечных жирных кислот и смеси этих и других масел. Также могут быть приготовлены инъекционные суспензии, и в этом случае могут быть использованы подходящие жидкие носители, суспендирующие агенты и тому подобное. Также включены твердые формы препаратов, которые предназначены для превращения незадолго до применения в жидкие формы препаратов. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно содержит агент, улучшающий проникновение, и/или подходящий смачивающий агент, необязательно в сочетании с подходящими добавками любой природы в незначительных пропорциях, причем эти добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут облегчать нанесение на кожу и/или могут быть полезны для приготовления желаемых композиций. Данные композиции могут быть введены различными способами, например с помощью трансдермального пластыря, прямо в мишень, путем нанесения мази.

Особенно выгодно готовить вышеупомянутые фармацевтические композиции в форме единицы дозирования для простоты введения и одинаковости дозирования. Единица дозирования лекарственной формы, применяемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активных ингредиентов, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких форм единиц дозирования являются таблетки (включая разламываемые таблетки или таблетки с покрытием), капсулы, пилюли, пакеты с порошком, быстрорастворимые таблетки, суппозитории, инъекционные растворы или суспензии и тому подобное, и их разделенные многократные дозирования.

Чтобы повысить растворимость и/или стабильность лекарственных средств в комбинациях, описанных в данном документе, в фармацевтических композициях, может быть выгодно применять α -, β - или γ -циклодекстрины или их производные, в частности гидроксилзамещенные циклодекстрины, например, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин или сульфобутил- β -циклодекстрин. Также ко-растворители, такие как спирты, могут улучшать растворимость и/или стабильность соединений согласно данному изобретению в фармацевтических композициях.

В зависимости от способа введения фармацевтическая композиция предпочтительно будет содержать от 0,05 до 99% по массе, более предпочтительно от 0,1 до 70% по массе, еще более предпочтительно от 0,1 до 50% по массе лекарственных средств в комбинациях, описанных в данном документе, и от 1 до 99,95% по массе, более предпочтительно от 30 до 99,9% по массе, еще более предпочтительно от 50 до 99,9% по массе фармацевтически приемлемого носителя, причем все проценты рассчитывают от общей массы композиции. Частота введения может представлять собой любую частоту, которая уменьшает тяжесть симптома гематологического злокачественного новообразования (например, уменьшает или обращает вспять фиброз костного мозга), не вызывая значительной токсичности у млекопитающего. Напри-

мер, частота введения может составлять от около одного раза в два месяца до около одного раза в неделю, или от около одного раза в месяц до около двух раз в месяц, или от около одного раза в шесть недель до около двух раз в месяц.

Частота введения может оставаться постоянной или может варьироваться в течение всего периода лечения. Курс лечения композицией, содержащей один или большее количество ингибиторов теломеразы, может включать в себя периоды отдыха. Например, композиция, содержащая ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2, может быть введена еженедельно в течение трехнедельного периода, за которым следует двухнедельный период отдыха, и такой режим можно повторять несколько раз. Как и в случае с эффективным количеством, различные факторы могут влиять на фактическую частоту введения, используемую для конкретного применения. Например, эффективное количество, продолжительность лечения, применение нескольких лекарственных агентов, способ введения и степень гематологической злокачественности могут потребовать увеличения или уменьшения частоты введения.

Эффективная продолжительность введения композиции, содержащей ингибитор теломеразы (например, иметельстат или иметельстат натрия) и ингибитор Bcl-2 (например, АВТ-199), может быть любой продолжительностью, которая уменьшает тяжесть симптома гематологического злокачественного новообразования (например, "уменьшает или обращает вспять фиброз костного мозга) не оказывая существенной токсичности на млекопитающее. Таким образом, эффективная продолжительность может варьировать от одного месяца до нескольких месяцев или лет (например, от одного месяца до двух лет, от одного месяца до одного года, от трех месяцев до двух лет, от трех месяцев до десяти месяцев или от трех месяцев до 18 месяцев). В целом, как правило, эффективная продолжительность лечения гематологического злокачественного новообразования может варьировать от двух до двадцати месяцев. В некоторых случаях, эффективная продолжительность может быть такой, пока живо млекопитающее. Множество факторов может влиять на фактическую эффективную продолжительность, используемую для определенного лечения. Например, эффективная продолжительность может варьировать в зависимости от частоты введения, эффективного количества, применения нескольких терапевтических агентов, пути введения, и степени гематологической злокачественности.

В некоторых случаях можно отслеживать ход лечения и тяжесть одного или нескольких симптомов, связанных с гематологическим злокачественным новообразованием. Может быть использован любой способ, чтобы определить, уменьшена или нет тяжесть симптома гематологического злокачественного новообразования. Например, степень тяжести симптома гематологического злокачественного образования (например, фиброз костного мозга) может быть оценена с использованием методов биопсии.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" обозначает соль, которая является приемлемой для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающего для данного режима дозирования). Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, соли которого являются производными от множества органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области техники, и включают в себя, только в качестве примера, натрий и тому подобное; и когда молекула содержит основную функциональность, соли органических или неорганических кислот, таких как гидрохлорид и тому подобное. Представляющие интерес фармацевтически приемлемые соли включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: соли алюминия, аммония, аргинина, бария, энзатина, кальция, холината, этилендиамина, лизина, лития, магния, меглюмина, прокаина, калия, натрия, трометамина, N-метилглюкамина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтаноламина, этаноламина, пиперазина, цинка, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтаноламина.

Термин "его соль(соли)" обозначает соединение, сформированное, когда протон кислоты заменяется катионом, таким как катион металла или органический катион и тому подобное. Предпочтительно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В качестве примера соли данных соединений включают в себя те соли, в которых соединение протонируется неорганической или органической кислотой с образованием катиона, с сопряженным основанием неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента соли. Представляющие интерес соли включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, соли алюминия, аммония, аргинина, бария, бензатина, кальция, цезия, холината, этилендиамина, лития, магния, меглюмина, прокаина, N-метилглюкамина, пиперазина, калия, натрия, трометамина, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтаноламина, этаноламина, пиперазина, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтаноламина. Понятно, что для любой из представленных в данном документе олигонуклеотидных структур, которые включают в себя каркас межнуклеозидных связей, такие олигонуклеотиды могут также включать в себя любые удобные солевые формы. В некоторых вариантах осуществления кислотные формы межнуклеозидных связей изборожены для упрощения. В некоторых случаях соль соединения согласно изобретению представляет собой соль одновалентного катиона. В некоторых случаях соль соединения согласно изобретению представляет собой соль двухвалентного катиона. В некоторых случаях соль соединения согласно изобретению представляет собой соль трехвалентного катиона. "Сольват" относится к комплексу, сформирован-

ному комбинацией молекул растворителя с молекулами или ионами растворенного вещества. Растворитель может быть органическим соединением, неорганическим соединением или смесью обоих. Некоторые примеры растворителей включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: метанол, A^f , A -диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и воду. Когда растворителем является вода, сформированный сольват представляет собой гидрат.

"Стереоизомер" и "стереоизомеры" относятся к соединениям, которые имеют одинаковую атомную связанность, но различаются расположением атомов в пространстве. Стереоизомеры включают в себя, например, цис-транс-изомеры, E и Z-изомеры, энантиомеры и диастереомеры. Что касается любой из раскрытых в данном документе групп, которые содержат один или большее количество заместителей, понятно, что такие группы не содержат каких-либо замещений или паттернов замещений, которые являются стерически непрактичными и/или синтетически неосуществимыми. Предполагается, что все стереоизомеры включены в объем данного раскрытия изобретения.

Специалист в данной области техники поймет, что возможны другие таутомерные расположения групп, описанных в данном документе. Понятно, что все таутомерные формы соединения согласно данному изобретению охватываются структурой, в которой описано одно возможное таутомерное расположение групп соединения, даже если это конкретно не указано.

Предполагается включение сольвата фармацевтически приемлемой соли таутомера стереоизомера соединения согласно данному изобретению. Предполагается, что они включены в объем данного раскрытия изобретения.

F. Введение и схемы введения

Для лечения гематологических онкологических заболеваний ингибиторы теломеразы (например, иметельстат или иметельстат натрия) и ингибиторы Bcl-2 (например, ABT-199, ABT-263 и ABT-737) могут быть введены в комбинации субъекту, нуждающемуся в лечении. Примером рака, который можно лечить данным способом, является острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), также называемый острым миелоцитарным лейкозом, острым миелогенным лейкозом, острым гранулоцитарным лейкозом или острым нелимфоцитарным лейкозом. При остром лейкозе лейкозные клетки представляют собой незрелые клетки крови (называемые бластными клетками), которые быстро растут и быстро делятся. Без лечения большинство пациентов с острым лейкозом проживало бы всего несколько месяцев.

Ингибиторы теломеразы и ингибиторы Bcl-2, применяемые в данном изобретении, могут быть введены в любой терапевтически эффективной дозе, например в дозах, сравнимых с теми, которые обычно применяют в клинической практике. Конкретные режимы дозирования для известных и одобренных противораковых агентов (например, рекомендуемая эффективная доза) известны врачам и приведены, например, в описаниях продуктов, обозначенных в PHYSICIANS' DESK REFERENCE, 2003, 57th Ed., Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J.; Goodman & Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS" 2001, 10th Edition, McGraw-Hill, New York; и/или доступны в Федеральном управлении по лекарственным средствам и/или обсуждаются в медицинской литературе.

В некоторых аспектах, доза ингибитора теломеразы, иметельстата натрия, вводимая субъекту, составляет от около 1,0 до около 13,0 мг/кг. В других аспектах доза ингибитора теломеразы составляет от около 6,5 до около 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора теломеразы включает в себя по меньшей мере около 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9 или 13 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивиду, включает в себя по меньшей мере около 1, 2,5, 3,5, 5, 6,5, 7,5, 9,4, 10, 15 или 20 мг/кг. В различных вариантах осуществления эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивиду, включает в себя меньше чем около 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 30, 25, 20, 10, 7,5, 6,5, 5, 3,5, 2,5 1 или 0,5 мг/кг ингибитора теломеразы. Иллюстративные частоты дозирования для фармацевтических композиций (например, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор теломеразы и/или фармацевтической композиции, содержащей ингибитор Bcl-2) включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, ежедневно; через сутки; дважды в неделю; трижды в неделю; еженедельно без перерыва; еженедельно, три из четырех недель; раз в три недели; раз в две недели; еженедельно, две из трех недель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят примерно один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в 8 недель. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят по меньшей мере примерно 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз или 7 раз (т.е., ежедневно) в неделю, или три раза в сутки, два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления интервалы между каждым введением составляют меньше чем около 6 месяцев, 3 месяцев, 1 месяца, 20 суток, 15 суток, 12 суток, 10 суток, 9 суток, 8 суток, 7 суток, 6 суток, 5 суток, 4 суток, 3 суток, 2 суток или 1 сутки. В некоторых вариантах осуществления интервалы между каждым введением составляют больше чем около 1 месяца, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 8 месяцев или 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления в графике дозирования нет перерывов. В некоторых вариантах осуществления интервал между каждым введением составляет не больше чем около недели.

Ингибиторы теломеразы, такие как иметельстат или иметельстат натрия, могут быть введены любым подходящим способом. Например, ингибиторы теломеразы, такие как иметельстат или иметельстат натрия, могут быть введены внутривенно один раз каждые 4 недели в течение определенного периода времени (например, один, два, три, четыре или пять часов). В одном варианте осуществления, иметельстат вводят внутривенно один раз в неделю в течение периода около 2 ч в дозе 7-10 мг/кг. В другом варианте осуществления иметельстат вводят внутривенно один раз каждые 3 недели в течение периода около 2 ч в дозе 2,5-7 мг/кг. В еще одном варианте осуществления иметельстат вводят внутривенно в течение периода около 2 ч один раз каждые 4 недели в дозе 0,5-5 мг/кг. В другом варианте осуществления иметельстат вводят внутривенно один раз каждые 3 недели в течение периода около 2 ч в дозе около 2,5-10 мг/кг. В еще одном варианте осуществления иметельстат вводят внутривенно в течение периода около 2 ч один раз каждые 4 недели в дозе около 0,5-9,4 мг/кг.

В таких случаях при лечении ингибитором Bcl-2, АВТ-199 доза АВТ-199 может составлять около или меньше чем 400 мг перорально один раз в сутки. Например, человека, идентифицированного как имеющего гематологическое злокачественное новообразование, могут лечить АВТ-199 в дозе, которая составляет а) 20 мг перорально один раз в сутки, б) 50 мг перорально один раз в сутки, с) 100 мг перорально один раз в сутки, d) 200 мг перорально один раз в сутки или е) 400 мг перорально один раз в сутки. В другом варианте осуществления АВТ-199 вводят в соответствии с еженедельным графиком повышения дозы в течение 5 недель до рекомендуемой суточной дозы в 400 мг, начиная с 20 мг перорально один раз в сутки в неделю 1, 50 мг перорально один раз в сутки неделю 2, 100 мг перорально один раз в сутки в неделю 3, 200 мг перорально один раз в сутки в неделю 4, и 400 мг перорально один раз в сутки в неделю 5 и далее. В другом варианте осуществления АВТ-199 вводят в дозе 400 мг перорально один раз в сутки. В другом варианте осуществления дозирование продолжают до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности.

Понятно, что лечение рака иногда включает в себя несколько "раундов" или "циклов" введения лекарственного средства, причем каждый цикл включает в себя введение лекарственного средства один или большее количество раз в соответствии с указанным графиком (например, каждые три недели в течение трех последовательных суток, один раз в неделю и т.д.). Например, противораковые лекарственные средства могут быть введены в течение от 1 до 8 циклов или в течение более длительного периода. Когда субъекту вводят больше чем одно лекарственное средство (например, два лекарственных средства), каждое может вводиться в соответствии с его собственным графиком (например, еженедельно; один раз в три недели и т.д.). Будет понятно, что введение лекарственных средств, даже тех, которые вводятся с различной периодичностью, можно координировать так, чтобы оба лекарства вводились в одни и те же сутки, по меньшей мере, некоторое время или, альтернативно, чтобы лекарства вводились в последовательные сутки, по меньшей мере, некоторое время. В схемах лечения, в которых ингибитор теломеразы (например, иметельстат или иметельстат натрия) и ингибитор Bcl-2 (например, АВТ-199 или Венетеклакс) вводят в комбинации, они могут быть введены в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор теломеразы вводят за одни сутки до, одни сутки после или в те же сутки, когда вводят ингибитор Bcl-2. Подразумевается, что могут использоваться другие графики, как определено врачом.

Как подразумевается в данной области техники, лечение противораковыми терапевтическими лекарственными средствами может быть временно приостановлено, если наблюдается токсичность, или для удобства пациента, не выходя за рамки изобретения, и затем возобновлено.

G. Введение в комбинации

Два или три лекарственных средства вводят субъекту "в комбинации", когда лекарства вводят как часть одного и того же курса терапии. Курс терапии относится к введению комбинаций лекарственных средств, которые, по мнению врача, должны работать аддитивно, взаимодополняя друг друга, синергически или иным образом, для получения более благоприятного результата, чем предполагалось для введения одного лекарства. Курс терапии может составлять одни или несколько суток, но чаще длится несколько недель.

Таким образом, примером введения в комбинации является введение иметельстата один раз каждые 28 суток в течение от 1 до 4 циклов, начиная с 1-х суток, и введение АВТ-199 один раз каждые 7 суток, начиная с 1-х суток в течение 4 циклов. В одном варианте осуществления введение АВТ-199 начинается в сутки 1, сутки -1 или сутки 2, или другие сутки в пределах цикла. В одном варианте осуществления введение в комбинации представляет собой введение иметельстата один раз каждые 28 суток в течение от 1 до 4 циклов, начиная с 1-х суток, и введение АВТ-199 один раз в сутки в течение 28 суток, начиная с 1-х суток в течение от 1 до 4 циклов.

Когда два лекарственных средства вводят в комбинации, могут быть применены различные схемы. В одном случае, например и без ограничения, лекарственное средство 1 сначала вводят до введения лекарственного средства 2, и лечение лекарственным средством 1 продолжают в течение всего курса введения лекарственного средства 2; альтернативно, лекарственное средство 1 вводят после начала или завершения терапии лекарственным средством 2; альтернативно, лекарственное средство 1 впервые вводят одновременно с началом другой терапии рака. Как применяется в данном контексте, "одновременно" означает, что два препарата вводятся в одни и те же сутки, или в следующие друг за другом сутки. Хотя в

принципе определенные лекарственные средства могут быть приготовлены вместе, в целом, как правило, их вводят в отдельных композициях. Аналогичным образом, хотя некоторые лекарственные средства могут быть введены одновременно, чаще (особенно для лекарственных средств, вводимых путем инфузии) лекарственные средства вводят в разное время в одни и те же сутки, в следующие друг за другом сутки, или по другому графику.

Изобретение также относится к комбинации, содержащей ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2. В частности, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В частности, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. Изобретение также относится к комбинации, содержащей ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2, для применения в качестве лекарственного средства. В частности, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В частности, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199.

Н. Диагностика

Для диагностики ОМЛ мазки крови и костного мозга исследуют морфологически с использованием окраски Май-Гринвальда-Гимзы или Райт-Гимзы. Рекомендуются подсчитать по меньшей мере 200 лейкоцитов в мазках крови и 500 ядросодержащих клеток в мазках костного мозга, причем последние должны содержать спиккулы. Для диагноза ОМЛ требуется наличие бластных клеток в костном мозге или крови в количестве 20% или больше, за исключением ОМЛ с t (15; 17), t (8; 21), inv (16) или t (16; 16) и некоторых случаев эритролейкемии. Миелобласты, монобласты и мегакариобласты включены в число бластных клеток. При ОМЛ с моноцитарной или миеломоноцитарной дифференциацией монобласты и промиелоциты, но не аномальные моноциты, считают бласт-эквивалентами. Эритробласты не считаются бластными клетками, за исключением редкого случая чистого эритроидного лейкоза.

И. Наборы

Данное изобретение также относится к набору, содержащему ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2. Также предложен набор, содержащий ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2, для применения в лечении гематологического онкологического заболевания. Такая терапия в некоторых случаях включает в себя введение ингибитора Bcl-2 субъекту, либо до, либо после, либо одновременно с введением ингибитора теломеразы. В некоторых случаях ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат.

В связанном аспекте согласно данному изобретению предложен набор, содержащий дозу ингибитора теломеразы в количестве, эффективном для ингибирования пролиферации раковых клеток у субъекта. В некоторых случаях набор содержит вкладыш с инструкциями по применению ингибитора теломеразы. Вкладыш может предоставлять пользователю один набор инструкций для применения ингибитора в комбинации с ингибитором Bcl-2. В некоторых случаях ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В некоторых случаях набор инструкций для комбинированной терапии может рекомендовать (i) более низкую дозу ингибитора теломеразы при применении в комбинации с ингибитором Bcl-2, (ii) более низкую дозу ингибитора Bcl-2 при применении в комбинации с ингибитором теломеразы и/или (iii) отличающийся режим дозирования для одного или обоих ингибиторов, от того, который обычно рекомендуется. Будет понятно, что в приведенных выше абзацах в некоторых случаях ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат; в некоторых случаях ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия; в некоторых случаях ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199.

Ж. Иллюстративные варианты осуществления

Один иллюстративный пример варианта осуществления изобретения представляет собой способ лечения, включающий в себя введение комбинации ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2 субъекту, нуждающемуся в лечении гематологического онкологического заболевания. В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В альтернативных вариантах осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199, АВТ-263 или АВТ-737. В еще одном варианте осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В одном варианте осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199.

Гематологическое онкологическое заболевание может представлять собой ОМЛ, идиопатическую тромбоцитопению, истинную полицитемию, первичный миелофиброз, системный мастоцитоз, хронический миелоидный лейкоз; хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную цитопению с дисплазией разных типов клеток, рефрактерную анемию 1-го типа с избытком бластных клеток, рефрактерную анемию 2-го типа с избытком бластных клеток, миелодиспластический синдром (МДС) с обнаруженной делецией (5q), неклассифицируемый МДС, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХМЛ), атипичный хронический миелолейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, миелопролиферативные/миелодиспластические синдромы неклассифицируемые, В-лимфобластный лейкоз/лимфому, Т-лимфобластный лейкоз/лимфому, диффузную крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную среднестенную В-лимфоцитарную лимфому, лимфомы/лейкемии Беркитта, фолликулярную лимфому, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-лимфоцитарный пролимфоцитарный лейкоз, лим-

фоплазмоцитарную лимфому/макроглобулинемию Вальденстрема, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы краевой зоны, посттрансплантационные лимфопролиферативные нарушения, ВИЧ-ассоциированные лимфомы, первичную выпотную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную кожную В-лимфоцитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммопатию неизвестного значения, вялотекущую множественную миелому и солитарные плазмочитомы (солитарную костную и экстрамедуллярную). В одном варианте осуществления гематологическое онкологическое заболевание представляет собой ОМЛ.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор теломеразы иметельстат вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; (с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия.

В некоторых вариантах осуществления АВТ-199 вводят в дозе: (а) около 50-400 мг АВТ-199 в сутки; (b) около 2 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 800 мг в 6-е сутки и ежесуточно после этого или (с) около 25 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 400 мг в 5-е сутки и ежесуточно после этого. Введение АВТ-199 возможно за одни сутки до, одни сутки после или в те же сутки, когда вводят ингибитор теломеразы.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке, включающий в себя приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора теломеразы и приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора Bcl-2. Способ может быть осуществлен *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. В другом варианте осуществления иметельстат представляет собой иметельстат натрия. В данном способе ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В некоторых вариантах осуществления гематологическая раковая клетка может представлять собой клетку следующего типа онкологического заболевания: острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), идиопатической тромбоцитемии, истинной полицитемии, первичного миелофиброза, системного мастоцитоза, хронического миелоидного лейкоза; хронического нейтрофильного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза, рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами, рефрактерной цитопении с дисплазией разных типов клеток, рефрактерной анемии 1-го типа с избытком бластных клеток, рефрактерной анемии 2-го типа с избытком бластных клеток, миелодиспластического синдрома (МДС) с обнаруженной делецией (5q), неклассифицируемого МДС, хронического миеломоноцитарного лейкоза (ХМЛ), атипичного хронического миелолейкоза, ювенильного миеломоноцитарного лейкоза, миелопролиферативных/миелодиспластических синдромов - неклассифицируемых, В-лимфобластного лейкоза/лимфомы, Т-лимфобластного лейкоза/лимфомы, диффузной крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной среднестенной В-клеточной лимфомы, лимфомы/лейкемии Беркитта, фолликулярной лимфомы, хронического лимфолейкоза (ХЛЛ)/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-лимфоцитарного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмочитарной лимфомы/макроглобулинемии Вальденстрема, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы краевой зоны, посттрансплантационных лимфопролиферативных нарушений, ВИЧ-ассоциированных лимфом, первичной выпотной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, первичной кожной В-лимфоцитарной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, моноклональной гаммопатии неизвестного значения, вялотекущей множественной миеломы, и обособленных плазмочитом (обособленной костной и экстрамедуллярной). В одном варианте осуществления клетка гематологического онкологического заболевания представляет собой клетку острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

Согласно данному изобретению также предложены наборы для комбинированной терапии. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой набор, содержащий: (а) дозу ингибитора теломеразы в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке; и (b) дозу ингибитора Bcl-2 в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке. В одном варианте осуществления данного набора ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор теломеразы (например, иметельстат/иметельстат натрия) и ингибитор BCL-2 (например, АВТ-199) для применения в лечении гематологического онкологического заболевания. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит иметельстат/иметельстат натрия и АВТ-199.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой ингибитор теломеразы для применения в способе лечения гематологического онкологического заболевания, включающем в себя введение комбинации ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2 субъекту, нуждающемуся в этом. Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой ингибитор Bcl-2 для применения в способе лече-

ния гематологического онкологического заболевания, включающем в себя введение ингибитора Bcl-2 и ингибитора теломеразы в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. Альтернативный вариант осуществления изобретения представляет собой комбинацию, содержащую ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2 для применения в способе лечения гематологического онкологического заболевания, включающем в себя введение комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. В данных вариантах осуществления комбинация ингибитора теломеразы и ингибитора Bcl-2 индуцирует апоптоз гематологических раковых клеток. В данных вариантах осуществления ингибитором теломеразы может быть иметельстат. В одном варианте осуществления иметельстат представляет собой иметельстат натрия. Также в данных вариантах осуществления ингибитором Bcl-2 может быть АВТ-199. Иметельстат может быть введен в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата раз в четыре недели; (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель или (с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели. АВТ-199 может быть введен в дозе: (а) около 50-400 мг АВТ-199 ежедневно; (b) около 2 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 800 мг в 6-е сутки и ежесуточно после этого или (с) около 25 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежесуточным увеличением до конечной дозы около 400 мг в 5-е сутки и ежесуточно после этого. В некоторых вариантах осуществления введение АВТ-199 представляет собой введение за одни сутки до, одни сутки после или в те же сутки, когда вводят ингибитор теломеразы.

В вариантах осуществления ингибитора теломеразы, ингибитора Bcl-2 или комбинации гематологическое онкологическое заболевание может представлять собой ОМЛ, идиопатическую тромбоцитопению, истинную полицитемию, первичный миелофиброз, системный мастоцитоз, хронический миелоидный лейкоз; хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную цитопению с дисплазией разных типов клеток, рефрактерную анемию 1-го типа с избытком бластных клеток, рефрактерную анемию 2-го типа с избытком бластных клеток, миелодиспластический синдром (МДС) с обнаруженной делецией (5q), неклассифицируемый МДС, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХМЛ), атипичный хронический миелолейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, миелопролиферативные/миелодиспластические синдромы - неклассифицируемые, В-лимфобластный лейкоз/лимфому, Т-лимфобластный лейкоз/лимфому, диффузную крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную среднестенную В-клеточную лимфому, лимфомы/лейкемии Беркитта, фолликулярную лимфому, хронический лимфолейкоз (ХЛЛ)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-лимфоцитарный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмоцитарную лимфому/макроглобулинемию Вальденстрема, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы краевой зоны, посттрансплантационные лимфопролиферативные нарушения, ВИЧ-ассоциированные лимфомы, первичную выпотную лимфому, внутрисосудистую крупноклеточную В-лимфоцитарную лимфому, первичную кожную В-лимфоцитарную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммопатию неизвестного значения, вялотекущую множественную миелому и солитарные плазмоцитомы (солитарную костную и экстрамедуллярную). В одном варианте осуществления гематологическое онкологическое заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Альтернативным вариантом осуществления изобретения является способ *in vitro* индукции апоптоза в гематологической раковой (онкологической) клетке, включающий в себя приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора теломеразы и приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством ингибитора Bcl-2. В одном варианте осуществления ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат. Иметельстат может представлять собой иметельстат натрия. Ингибитором Bcl-2 может быть АВТ-199.

В некоторых вариантах осуществления способа *in vitro* гематологическая раковая клетка может представлять собой клетку следующего типа онкологического заболевания: острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), идиопатической тромбоцитопении, истинной полицитемии, первичного миелофиброза, системного мастоцитоза, хронического миелоидного лейкоза; хронического нейтрофильного лейкоза, хронического эозинофильного лейкоза, рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами, рефрактерной цитопении с дисплазией разных типов клеток, рефрактерной анемии 1-го типа с избытком бластных клеток, рефрактерной анемии 2-го типа с избытком бластных клеток, миелодиспластического синдрома (МДС) с обнаруженной делецией (5q), неклассифицируемого МДС, хронического миеломоноцитарного лейкоза (ХМЛ), атипичного хронического миелолейкоза, ювенильного миеломоноцитарного лейкоза, миелопролиферативных/миелодиспластических синдромов - неклассифицируемых, В-лимфобластного лейкоза/лимфомы, Т-лимфобластного лейкоза/лимфомы, диффузной крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной среднестенной В-клеточной лимфомы, лимфомы/лейкемии Беркитта, фолликулярной лимфомы, хронического лимфолейкоза (ХЛЛ)/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-лимфоцитарного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы/макроглобулинемии Вальденстрема, мантийноклеточной лимфомы, лимфомы краевой зоны, посттрансплантационных лимфопролиферативных нарушений, ВИЧ-

ассоциированных лимфом, первичной выпотной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-лимфоцитарной лимфомы, первичной кожной В-лимфоцитарной лимфомы, волосатоклеточного лейкоза, моноклональной гаммопатии неизвестного значения, вялотекущей множественной миеломы, и обособленных плазмоцитом (обособленной костной и экстрамедуллярной). В одном варианте осуществления способа *in vitro*, гематологическая раковая клетка представляет собой клетку острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой комбинацию, содержащую ингибитор теломеразы и ингибитор Bcl-2. В одном варианте осуществления, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. В другом варианте осуществления, ингибитор теломеразы представляет собой иметельстат натрия, а ингибитор Bcl-2 представляет собой АВТ-199. Комбинация может быть использована в качестве лекарственного средства.

Другим вариантом осуществления изобретения является применение иметельстата или иметельстата натрия для лечения гематологического онкологического заболевания у пациента, проходящего терапию с BCL-ингибированием. Альтернативным вариантом осуществления является применение АВТ-199 для лечения гематологического онкологического заболевания у пациента, проходящего терапию с ингибированием теломеразы. Еще одним вариантом осуществления изобретения является иметельстат натрия для применения в способе лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), причем способ включает в себя введение иметельстата натрия и АВТ-199 в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. Дополнительным вариантом осуществления является АВТ-199 для применения в способе лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), причем способ включает в себя введение АВТ-199 и иметельстата натрия в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. Дополнительным вариантом осуществления является комбинация, содержащая иметельстат натрия и АВТ-199, для применения в способе лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), причем способ включает в себя введение комбинации субъекту, нуждающемуся в этом. Как применяется в данных вариантах осуществления, иметельстат натрия может быть введен в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, каждый цикл включает в себя: (а) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия раз в четыре недели; (б) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия один раз в неделю в течение четырех недель; (с) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата натрия один раз в три недели или (д) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата натрия один раз в четыре недели. Дополнительно, в данных вариантах осуществления АВТ-199 может быть введен в дозе: (а) около 50-400 мг АВТ-199 ежедневно; (б) около 2 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы около 800 мг в 6-е сутки и ежедневно после этого или (с) около 25 мг АВТ-199 в 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы около 400 мг в 5-е сутки и ежедневно после этого. В некоторых из этих вариантов осуществления введение АВТ-199 осуществляют за одни сутки до, одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат натрия.

Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой *in vitro* способ индукции апоптоза в клетке острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающий в себя приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством иметельстата натрия и приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством АВТ-199.

Во всех вышеуказанных вариантах осуществления ингибитор теломеразы может представлять собой иметельстат, а ингибитор Bcl-2 может представлять собой АВТ-199. Более конкретно, во всех приведенных выше вариантах осуществления ингибитор теломеразы может представлять собой иметельстат натрия, а ингибитор Bcl-2 может представлять собой АВТ-199.

Данное изобретение дополнительно иллюстрируется, но не ограничивается, следующими примерами.

Примеры

Пример 1. Ингибитор теломеразы иметельстат натрия в комбинации с ингибитором BCL-2 вени-токлаксом усиливает апоптоз в клеточных линиях ОМЛ *in vitro*

Опухолевые клетки KG-1 (АКТП (Американская коллекция типовых культур) № CCL-246) и MOLM-13 ОМЛ (DSMZ № ACC554) высевали с плотностью около 20000 клеток/лунка в 96-луночные полистироловые U-дноподобные плашки для культивирования тканей (№ 353777 каталога Corning) в RPMI-1640 (№ 11875-085 каталога ThermoFisher) дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (№ 16140-089 каталога ThermoFisher) и 1% смесью антибиотиков пенициллин/стрептомицин (№ 15140-122 каталога ThermoFisher) и выращивали в инкубаторе с 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки тут же обрабатывали иметельстатом натрия (Janssen Biotech, Inc.), приготовленным в RPMI-1640, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, и/или АВТ-199 (№ S8048 каталога Selleckchem), приготовленным в виде 1000-кратного стокового раствора в ДМСО, разведенного 1:100 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, носитель; № 20012-027 каталога ThermoFisher). В 96-часовых экспериментах вторую дозу соединения(ний) применяли через 48 ч без добавления свежей среды, так как АВТ-199 и иметельстат натрия имеют период полураспада *in vitro* менее 48 ч (Shammas et al., Leukemia, 22(7): 1410-1418 (2008)). Иметельстат натрия был протестирован от 0-50 мкМ, и АВТ-199 был протестирован от 0-500 нМ. Контрольные некомплементарные и с неполной комплементарностью олигонуклеотиды (US 7998938), показанные

в табл. 2, применяли в таких же концентрациях что и иметельстат натрия, чтобы показать, что эффекты являются специфичными для комбинации иметельстата натрия и АВТ-199.

Таблица 2. Последовательность, нацеленная на hTR

Иметельстат натрия ^a	5'-R-TAGGGTTAGACAA-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:1
Олигонуклеотид с неполной комплементарностью ^b	5'-R-TAGGTGTAAGCAA-NH ₂ -3'	SEQ ID NO:2
Некомплементарный олигонуклеотид ^c	5'-AACAGATTGGGAT-R-3'	SEQ ID NO:3
R представляет собой: ^a Пальмитоил [(CH₂)₁₄CH₃] амид конъюгирован через аминоклицириновый линкер с 5'-тиофосфатной группой N3' → P5'-тиофосфоридами (NPS)-соединенного олигонуклеотида. ^b Пальмитоил [(CH₂)₁₄CH₃] амид конъюгирован через аминоклицириновый линкер с 5'-тиофосфатной группой N3' → P5'-тиофосфоридами (NPS)-соединенного олигонуклеотида. ^c Пальмитоил [(CH₂)₁₄CH₃] амид конъюгирован через концевую 3'-аминогруппу олигонуклеотида NPS.		

В 48 и 96 ч клетки проверяли на наличие здоровых, раннеапоптотических и апоптотических популяций с помощью набора для анализа проточной цитометрией с аннексином V (окрашивает внутреннюю сторону клеточной мембраны) и йодидом пропидия (PI, ДНК-связывающий краситель) (№ 640914 каталога BioLegend). Аннексин V обнаруживает экстернализацию фосфатидилсерина в апоптотических клетках с использованием рекомбинантного аннексина V, конъюгированного с зеленым флуоресцентным красителем FITC, и мертвые клетки с использованием йодида пропидия (PI). Йодид пропидия окрашивает некротические клетки красной флуоресценцией. После обработки обоими зондами раннеапоптотические клетки демонстрируют зеленую флуоресценцию, апоптотические (мертвые) клетки показывают красную и зеленую флуоресценцию, а живые клетки показывают небольшую флуоресценцию или ее отсутствие. Вкратце, клетки осаждали и промывали 2 раза ФСБ перед суспендированием в буфере для связывания аннексина V, содержащем анти-аннексин V-FITC и йодид пропидия в соотношении 1:2, в соответствии с предложенным производителем протоколом. Клетки окрашивали в течение 30 мин при 4°C в темноте с последующим 3-кратным промыванием ФСБ и суспензией в FAC-красящим буфере (№ 554657 каталога BD), перед получением данных на проточном цитометре BD FACS Canto для прямого рассеяния, бокового рассеяния, FITC, и каналов PE. Клеточные популяции анализировали, применяя программное обеспечение Cytobank, и сравнивали с режимами (без иметельстата натрия или АВТ-199) без обработки для установления границ проникновения для жизнеспособных клеток (неокрашенные в любом канале; т.е. дважды-отрицательные популяции). Для всех экспериментов точечные графики данных проточной цитометрии показывают четыре квадранта с процентом живых клеток в нижнем левом квадранте, процентом раннеапоптотических клеток (аннексин V+/PI-) в верхнем левом квадранте, и процентом апоптотических (мертвых) клеток (дважды меченых аннексином V+/PI+) в верхнем правом квадранте. Процент апоптотических клеток (дважды меченых) был использован для расчета комбинированных эффектов применяя модели аддитивности наибольшего эффекта одиночного агента (HSA - Highest Single Agent) и Bliss (J Tang et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2015; 6 (181)).

Используя модель HSA, цитотоксический эффект комбинированного режима ("C") сравнивали с эффектом, продуцируемым каждым из контрольных одиночных агентов ("A" или "B") для соответствующей дозы в комбинации:

Превышение по сравнению с HSA = C - A (если A > B) или C - B (если A < B)

Модель Bliss выполняет аналогичное сравнение, но вместо наивысшего эффекта одиночного агента модель Bliss вычитает из комбинации значение, равное сумме каждого отдельного агента за вычетом их продукта:

Превышение по сравнению с BLISS = C - [(A+B) - (A*B)]

Данные модели способны показать аддитивность или слабую синергию в комбинации.

Результаты обработки линии клеток ОМЛ

Точечные графики данных проточной цитометрии для клеток KG-1 после 48-часовой обработки иметельстатом натрия и/или АВТ-199 показаны на фиг. 1А, с графиком % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации АВТ-199 при различных концентрациях иметельстата натрия, показанным на фиг. 1В. KG-1 проявляет незначительную чувствительность к АВТ-199 через 48 ч (~9% и ~14% при 100 и 500 нМ соответственно) и минимальную чувствительность к иметельстату натрия. Однако, когда обработку 50 мкМ иметельстата натрия комбинируют с 100 или 500 нМ АВТ-199, наблюдается больший эффект на гибель клеток (~27% при 100 нМ и ~50% при 500 нМ). В табл. 3 и 4

показаны расчеты комбинированного эффекта с использованием моделей HSA или BLISS при обработке клеток KG-1 через 48 ч. Отрицательные значения не указывают на антагонизм в данных моделях, только отсутствие взаимодействия.

Таблица 3. Превышение по сравнению с наибольшим эффектом одиночного агента для клеток KG-1 через 48 ч с ABT-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	0	2	9	18	36
	25	0	2	3	5	7	9
	10	0	1	2	2	4	2
	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 4. Превышение по сравнению с BLISS для клеток KG-1 через 48 ч с ABT-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	-5	-2	3	11	28
	25	0	-4	-2	-1	0	2
	10	0	-5	-3	-4	-2	-3
	0	0	0	0	0	0	0

Точечные графики данных проточной цитометрии для клеток KG-1 после 96-часовой обработки иметельстатом натрия и/или ABT-199 показаны на фиг. 2А, с графиком % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации ABT-199 при различных концентрациях иметельстата натрия, показанным на фиг. 2В. KG-1 проявляет незначительную чувствительность к ABT-199 через 96 ч (~6% и ~10% при 100 и 500 нМ соответственно), и также наблюдали некоторую чувствительность к иметельстату натрия (5, 9 и 16% при 10, 20 и 50 мкМ соответственно). Однако, когда обработку 25 или 50 мкМ иметельстата натрия комбинируют с 20-500 нМ ABT-199, наблюдается больший эффект на гибель клеток при всех концентрациях. В табл. 5 и 6 показаны расчеты комбинированного эффекта с использованием моделей HSA или BLISS при обработке клеток KG-1 через 96 ч.

Таблица 5. Превышение по сравнению с наибольшим эффектом одиночного агента для клеток KG-1 через 96 ч с ABT-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	4	6	13	20	65
	25	0	3	4	7	12	26
	10	0	1	2	5	7	10
	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 6. Превышение по сравнению с BLISS для клеток KG-1 через 48 часов с ABT-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	5	1	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	1	3	10	16	57
	25	0	0	0	3	7	18
	10	0	-2	-1	1	2	5
	0	0	0	0	0	0	0

Показаны точечные графики данных проточной цитометрии для клеток KG-1 после обработки через 48 часов (фиг. 3А) или 96 часов (фиг. 4А) с некомплементарными или неполностью комплементарными олигонуклеотидами и ABT-199. Графики % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации ABT-199 при различных концентрациях олигонуклеотидов показаны для 48 часов (фиг. 3В) или 96 часов (фиг. 4В). Модели превышения HSA (табл. 7 и 8) и превышения Bliss (табл. 9 и 10) подтверждают отсутствие эффекта с олигонуклеотидными контролями. Отрицательные значения не указывают на антагонизм в данных моделях, только отсутствие взаимодействия.

Таблица 7. Превышение по сравнению с HSA для клеток KG-1 через 48 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-3	-2	-3	-5	-8
	25	0	-3	-2	-2	-3	-5
Некомплементарный, мкМ	50	0	-2	1	-1	-3	-5
	25	0	-2	-1	-2	-3	-3

Таблица 8. Превышение по сравнению с HSA для клеток KG-1 через 96 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	2	3	2	2	3
	25	0	0	0	0	0	-3
Некомплементарный, мкМ	50	0	1	1	1	1	-2
	25	0	0	0	0	-1	-2

Таблица 9. Превышение по сравнению с BLISS для клеток KG-1 через 48 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-5	-5	-6	-8	-11
	25	0	-5	-4	-4	-5	-7
Некомплементарный, мкМ	50	0	-5	-2	-4	-6	-8
	25	0	-5	-4	-5	-5	-5

Таблица 10. Превышение по сравнению с BLISS для клеток KG-1 через 96 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-2	-1	-2	-2	-1
	25	0	-4	-3	-4	-4	-7
Некомплементарный, мкМ	50	0	-2	-2	-2	-2	-5
	25	0	-2	-3	-3	-3	-5

Точечные графики данных проточной цитометрии для клеток MOLM-13 после 48-часовой обработки иметельстатом натрия и/или ABT-199 показаны на фиг. 5А, с графиком % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации ABT-199 при различных концентрациях иметельстата натрия, показанным на фиг. 5В.

MOLM-13 проявляет некоторую чувствительность к ABT-199 через 48 ч (~19% и ~30% при 100 и 500 нМ соответственно) и некоторую чувствительность к иметельстату натрия (21,5% при 50 мкМ). Однако, когда 25 мкМ иметельстата натрия комбинировали с ABT-199, наблюдали больший эффект на гибель клеток (~32% и ~72% при 100 и 500 нМ соответственно). Наибольший эффект на гибель клеток наблюдали с 50 мкМ иметельстата натрия в комбинации с ABT-199 при 100 нМ (62%) и 500 нМ (88%). Удивительно, что в комбинации с иметельстатом натрия в концентрации 50 мкМ ABT-199 показал эффект на гибель клеток при более низких концентрациях 5 и 20 нМ. В табл. 11 и 12 показаны расчеты комбинированного эффекта с использованием моделей HSA или BLISS для обработки клеток MOLM-13 через 48 ч.

Таблица 11. Превышение по сравнению с наибольшим эффектом одиночного агента для клеток MOLM-13 через 48 ч с АВТ-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с HSA		АВТ-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	6	9	19	40	58
	25	0	2	4	8	13	42
	10	0	3	3	6	3	14
	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 12. Превышение по сравнению с BLISS для клеток MOLM-13 через 48 ч с АВТ-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с BLISS		АВТ-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	-2	-1	9	25	43
	25	0	-8	-7	-3	2	33
	10	0	-6	-7	-4	-7	6
	0	0	0	0	0	0	0

Точечные графики данных проточной цитометрии для клеток MOLM-13 после 96-часовой обработки иметельстатом натрия и/или АВТ-199 показаны на фиг. 6А, с графиком % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации АВТ-199 при различных концентрациях иметельстата натрия, показанным на фиг. 6В. MOLM-13 проявляет чувствительность к АВТ-199 через 96 ч (> 30% клеточной гибели при 5, 20, 100 и 500 нМ) и чувствительность к иметельстату натрия ($\geq$ 30% при 10, 25 и 50 мкМ). При всех концентрациях комбинированной обработки АВТ-199 плюс иметельстат натрия наблюдается усиление уничтожения клеток. Больше чем 90% гибель клеток наблюдали при самой низкой концентрации иметельстата натрия (10 мкМ), когда комбинировали с самой высокой концентрацией АВТ-199 (500 нМ). Больше чем 90% гибель клеток также наблюдали при концентрациях АВТ-199 100 и 50 нМ в комбинации. При самой высокой концентрации иметельстата натрия (50 мкМ) наблюдали почти полную гибель клеток при концентрациях АВТ-199 5, 10, 20, 100 и 500 нМ. В табл. 13 и 14 показаны расчеты комбинированного эффекта с использованием моделей HSA или BLISS для обработки клеток MOLM-13 через 96 ч.

Таблица 13. Превышение по сравнению с наибольшим эффектом одиночного агента для клеток MOLM-13 через 96 ч с АВТ-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с HSA		АВТ-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	26	41	49	49	50
	25	0	14	26	33	46	58
	10	0	10	11	23	25	56
	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 14. Превышение по сравнению с наибольшим эффектом одиночного агента для клеток MOLM-13 через 96 ч с АВТ-199 и иметельстатом натрия

Превышение по сравнению с BLISS		АВТ-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Иметельстат натрия, мкМ	50	0	13	23	26	27	32
	25	0	-1	4	11	23	37
	10	0	-8	-7	7	9	37
	0	0	0	0	0	0	0

Точечные графики данных проточной цитометрии для клеток MOLM-13 показаны после обработки через 48 ч (фиг. 7А) или 96 ч (фиг. 8А) с неполностью комплементарными или некомплементарными олигонуклеотидами и АВТ-199. Графики % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации АВТ-199 при различных концентрациях олигонуклеотидов показаны для 48 ч (фиг. 7В) или 96 ч (фиг. 8В). Модели превышения HSA (табл. 15 и 17) и превышения Bliss (табл. 16 и 18) подтверждают отсутствие эффекта с олигонуклеотидными контролями. Отрицательные значения не указывают на антагонизм в данных моделях, только отсутствие взаимодействия.

Таблица 15. Превышение по сравнению с HSA для клеток MOLM-13 через 48 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-4	-1	4	-1	3
	25	0	0	-1	1	0	5
Некомплементарный, мкМ	50	0	1	0	5	6	3
	25	0	-1	-2	0	-1	-2

Таблица 16. Превышение по сравнению с BLISS для клеток MOLM-13 через 48 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-10	-7	-2	-6	-1
	25	0	-6	-7	-5	-6	0
Некомплементарный, мкМ	50	0	-8	-9	-3	-2	-4
	25	0	-8	-9	-7	-8	-8

Таблица 17. Превышение по сравнению с HSA для клеток MOLM-13 через 96 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с HSA		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-22	-32	-39	-37	-32
	25	0	-15	-26	-33	-29	-17
Некомплементарный, мкМ	50	0	-18	-24	-31	-40	-33
	25	0	-10	-22	-28	-21	-16

Таблица 18. Превышение по сравнению с BLISS для клеток MOLM-13 через 96 ч с некомплементарными или неполностью комплементарными контролями

Превышение по сравнению с BLISS		ABT-199, нМ					
		0	1	5	20	100	500
Неполностью комплементарный, мкМ	50	0	-25	-34	-41	-40	-35
	25	0	-24	-33	-39	-36	-25
Некомплементарный, мкМ	50	0	-24	-29	-35	-44	-38
	25	0	-19	-29	-34	-28	-24

Пример 2. Исследования механизма взаимодействия между иметельстатом натрия и ABT-199 в обработанных клетках

Механистически иметельстат натрия функционирует в основном за счет ингибирования активного сайта ферментативного комплекса теломеразы. В таком случае, концы теломер, на которых функционирует фермент, не удлиняются. Благодаря быстрому и повторяемому клеточному делению опухолевых клеток они со временем становятся уязвимыми к прогрессирующему уменьшению теломер. Когда процесс восстановления теломер заблокирован, клетки постепенно приближаются к кризису, и в конечном итоге инициируют апоптоз (Bruedigam et al., Cell Stem Cell., 15: 775-790 (2014)). Bcl-2 и связанные с ним члены семейства играют роль в доставке анти-апоптотических сигналов к опухолевым клеткам. Bcl-2 функционирует путем ингибирования Вах, который является ключевым медиатором в сигналинге высвобождения апоптотических факторов, которые вызывают почти нормальную запрограммированную клеточную гибель. При воздействии данных сигналов Вах транслоцируется в митохондрии, высвобождая цитохром c и другие апоптотические факторы, которые приводят к активации каскада каспаз, и что завершается гибелью клеток через митохондриальный сигнальный путь (т.е., не опосредованный рецептором -TRAIL, ФНОα и т.д.). Присутствие Bcl-2 вызывает блокирование данных сигналов, так как Bcl-2 может напрямую ингибировать Вах. Без Вах апоптотические факторы не высвобождаются, а клетки становятся независимыми от апоптотических сигналов.

Эти два пути сходятся поскольку первичный белковый компонент теломеразы, hTERT, также выполняет вспомогательные роли в митохондриальном апоптотическом пути, которые пересекаются с Bcl-2. Кроме того, известно, что Bcl-2 также увеличивает экспрессию hTERT и последующую активность теломеразы, дополнительно уменьшая апоптоз в опухолевых клетках. Было показано, что hTERT способен перехватывать Вах до того, как он достигнет митохондрий и запустить каскад апоптотических сигналов. Кроме того, в митохондриях hTERT может усиливать ингибирующее действие Bcl-2 на Вах. Чтобы дополнительно выяснить механизм взаимодействия между иметельстатом натрия и ABT-199 в обработанных клетках, экспрессию hTERT измеряли путем оценки уровней транскрипции с использованием кПЦР-РВ, а активность теломеразы оценивали с использованием белка из лизированных клеток в анализе TRAP на основе ПЦР.

Транскрипционные уровни hTERT

Образцы из клеточных экспериментов (и одиночные контрольные агенты) были отобраны для молекулярного анализа, чтобы оценить эффекты комбинаций, способствующих предполагаемым механизмам действия. Клетки ОМЛ выращивали в колбах Falcon T25 (№ 353135 каталога Corning) в партиях по 8 млн клеток в 8 мл среды, с дозой либо 50 мкМ иметельстата натрия, 20 нМ ABT-199, 50 мкМ иметельстата натрия плюс 20 нМ ABT-199, либо без лекарственного средства, в течение 48 и 96 ч, подобно предыдущим экспериментам, а затем собирали в виде клеточного осадка для лизирования и либо выделения нуклеиновой кислоты, либо белка. Нуклеиновые кислоты очищали, сперва лизируя клетки с помощью 350 мкл буфера RLT (№ 1030963 каталога Qiagen), дополненного 2-меркаптоэтанолом (№ 63689-100ML-F каталога Sigma). РНК очищали с помощью мини-набора AllPrep RNA/DNA (№ 80204 каталога Qiagen) и обратно транскрибировали в к ДНК применяя набор High Capacity cDNA (№ 4368814 каталога ThermoFisher) и предварительно амплифицировали перед анализом с помощью TaqMan PreAmp Master Mix (№ 4384557B каталога ThermoFisher). Продукты анализировали, используя собственноручно разработанный анализ кПЦР-РВ Taq-Man для измерения уровней транскрипции hTERT (TaqMan Universal PCR Master Mix - № 4304437 каталога ThermoFisher; последовательности праймеров и зондов ниже), применяя систему ПНР в реальном времени ViiA7 от ThermoFisher:

hTERT полноразмерный форвардный: 5'-TGACTTTGTCAAGGTGGATGTGA-3' (SEQ

ID NO:4)

hTERT полноразмерный реверсный: 5'-GCTGGAGGTCTGTCAAGGTAGAG-3' (SEQ ID

NO:5)

hTERT FAM-проба: FAM 5'-CGCGTACGACACCAT-3' MGBNFQ (SEQ ID NO:6)

где FAM представляет собой флуоресцентный репортер и MGBNFQ представляет собой гаситель.

Столбчатые диаграммы, обозначающие экспрессию hTERT после 48 и 96-часовой обработки иметельстатом натрия и/или ABT-199, показаны на фиг. 9. Уровни экспрессии РНК, измеренные с помощью кПЦР-РВ, показаны в процентах от необработанных контролей при одном и том же времени воздействия. Результаты показывают, что клетки KG-1 имеют минимальное снижение (90-95% по сравнению с контролем в любой момент времени) уровней РНК hTERT при обработке с помощью ABT-199, а клетки MOLM-13 показывают лишь незначительное снижение уровней транскрипции hTERT после 96 ч дозирования (около 69% по сравнению с контролем). Обработка иметельстатом натрия показывает большее снижение уровней РНК для обеих клеточных линий, с более низкой экспрессией при более длительных сроках обработки (клетки KG-172% от контроля через 48 ч и 47% от контроля через 96 ч; клетки MOLM-13-39% через 48 ч до не обнаруживаемого путем анализа уровня через 96 ч). Для комбинации иметельстата натрия и ABT-199 экспрессия hTERT не изменилась по сравнению с единственным агентом - иметельстатом натрия, для KG-1. Для MOLM-13 в оба момента времени hTERT был необнаружим.

Ферментные уровни hTERT

Образцы из предыдущего раздела для анализа белка собирали в виде клеточных осадков путем центрифугирования в течение 5 мин при 1500K для лизиса и выделения белка. Белковые лизаты были проанализированы с использованием модифицированного способа, объединенного из двух первичных источников (Hou et al. (2001) 43(3) 519-524 and Nature Protocols (2006) 1 (3) 1583-1590). Лизаты получали путем добавления 80 мкл 10 мМ Трис-ЭДТК, 1% NP-40, 10% глицерина, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 250 мкМ дезоксихолата натрия, 100 мкМ AEBSE, 5 мМ 2-меркаптоэтанольного буфера и инкубации на льду в течение 30 мин. Лизаты центрифугировали в течение 15 мин при максимальной скорости и при 4°C для осаждения клеточного дебриса. Выход белка из очищенных лизатов определяли количественно применяя анализ BCA (№ 23252 каталога ThermoFisher) и подвергали анализу на основе кПЦР TRAP для определения относительной активности теломеразы (Power SYBR Green PCR Master Mix - № 4367659 каталога ThermoFisher) применяя систему ПНР в реальном времени ViiA7 от ThermoFisher. В данном анализе белковые лизаты подвергают воздействию синтетических олигонуклеотидов, имитирующих теломерные последовательности, в присутствии избытка дНТФ и зеленого красителя SYBR. Чем больше активность теломеразы, тем больше достраивание синтетических праймеров и, следовательно, большее окрашивание

нуклеиновой кислоты и сигнала, создаваемого красителем SYBR. Данный сигнал сравнивают со стандартной кривой контрольного белкового лизата для определения относительной активности теломеразы среди образцов.

Форвардный праймер: 5' - AATCCGTCGAGCAGAGTT - 3' (SEQ ID NO:7)

Реверсный праймер: 5' - GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC - 3' (SEQ ID NO:8)

Результаты по молекулярным взаимодействиям

Столбчатые диаграммы, обозначающие активность теломеразы после 48 и 96-часовой обработки иметельстатом натрия и/или ABT-199, показаны на фиг. 10. Через 48 ч ABT-199 не оказывает влияния на активность теломеразы как в клетках KG-1, так и в клетках MOLM-13 при использовании в качестве единственного агента. Через 96 ч обработки ABT-199 активность теломеразы была снижена до около 80% в KG-1 и около 70%, что указывает на то, что ABT-199 мало влияет на активность теломеразы. Иметельстат натрия продемонстрировал снижение активности теломеразы в клеточных линиях KG-1 и MOLM-13. В клетках MOLM-13 снижение по сравнению с контролем было сопоставимым в обеих временных точках (37% для 48 ч, 44% для 96 ч). KG-1, однако, показала большее снижение активности теломеразы при обработке иметельстатом натрия через 96 ч (64% для 48 ч, 16% для 96 ч). При комбинированной обработке KG-1 показала минимальные отличия от иметельстата натрия в качестве единственного агента, тогда как в MOLM-13 снижение активности теломеразы было практически не обнаружимо с помощью анализа ПЦР.

Пример 3. Выяснение синергии комбинации

Обработку модельной клеточной линии MOLM-13 опухолевых клеток ОМЛ повторяли в экспериментальном формате, описанном в примере 1, со следующими изменениями: соединения иметельстат натрия, неполностью комплементарный контроль и некомплементарный контроль тестировали в более высоких концентрациях от 0 до 75 мкМ (всего семь концентраций) и ABT-199 тестировали в концентрациях 20 пМ - 1 мкМ (всего девять концентраций). Обработанные клетки анализировали проточной цитометрией на окрашивание аннексином V и йодидом пропидия, как описано ранее.

Результаты, собранные в апоптотической популяции (аннексии V+/йодид пропидия+), были использованы для определения баллов синергизма для матрицы комбинаций. Анализ данных комбинаций был произведен с помощью Horizon Chalice™ Analyzer Software (Horizon Discovery Group, Кембридж, Великобритания). Дополнительно был выполнен эксперимент *in vitro* с MOLM-13, а также клеточной линией HL-60, чтобы оценить синергию иметельстата натрия плюс ABT-199 при однократном воздействии комбинацией (т.е. без повторного введения через 48 ч). Диапазоны доз ABT-199 были слегка изменены (500 пМ - 100 нМ, всего пять концентраций) и сравнивали с эквивалентными точками данных в эксперименте, описанном выше, где клетки обрабатывали дозой второй раз через 48 ч. Неполностью комплементарный и комплементарный контроли не применяли в данном эксперименте.

Для статистической оценки эффектов, наблюдаемых в обработанных клетках MOLM-13, комбинации дозировок оценивали с помощью веб-приложения Horizon Chalice™ Analyzer Software, которое обобщает необработанные данные из изоболлярного анализа с фиксированным коэффициентом дозирования в соответствии с способом Чоу и Талалай (Chou TC, Talalay P., *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27-55). Комбинированные режимы подвергаются изоболлярному анализу для генерирования индекса комбинации и графического представления поведения комбинации, с синергетическими парами, попадающими ниже изоболограммы, и антагонистическими попадающими выше ее (ожидается попадание аддитивных комбинаций на линию). Программное обеспечение Horizon Chalice™ Analyzer дополнительно предоставляет оценку синергии, причем значения больше 1 указывают на синергию.

График % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации ABT-199 при различных концентрациях иметельстата натрия для 48-часовой обработки показан на фиг. 11. в табл. 19 показаны расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для каждой комбинации для клеток MOLM-13 после 48-часовой обработки. Значения, превышающие ноль, находятся в верхнем правом квадранте табл. 19, где концентрации ABT-199 больше чем или равны 20 нМ, а концентрации иметельстата натрия больше чем или равны 25 мкМ. Программное обеспечение Horizon Chalice™ Analyzer дополнительно предоставляет оценку синергии, причем значения больше 1 указывают на синергию. Для клеток, обработанных иметельстатом натрия, через 48 ч было установлено, что бал синергии составляет 5,12. Это по сравнению с балами 0,22 и 0,41 для неполностью комплементарного и некомплементарного контролей (табл.20 и 21), соответственно. График % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации ABT-199 при различных концентрациях иметельстата натрия для 48-часовой обработки показан на фиг. 12А и 12В для неполностью комплементарного и некомплементарного контролей соответственно.

Таблица 19. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 48-часовой обработки иметельстатом натрия

Превышение Loewe; Бал синергии = 5,12		Иметельстат натрия, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
АВТ-199, нМ	1000	-4	-2	-3	3	45	56	56
	500	5	10	1	2	44	54	54
	100	5	9	12	6	33	51	54
	20	0	1	4	1	22	40	51
	5	-4	-1	-4	0	7	25	39
	1	1	0	-1	-5	-4	6	24
	0,2	3	5	7	1	-1	2	14
	0,04	13	10	10	9	0	1	8
	0		9	7	1	-4	4	2

Таблица 20. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 48-часовой обработки неполностью комплементарным контролем

Превышение Loewe; Бал синергии = 0,22		Неполностью комплементарный, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
АВТ-199, нМ	1000	-4	1	-1	-1	-11	-16	-16
	500	5	4	3	-4	-10	-15	-14
	100	5	1	2	-3	-9	-16	-19
	20	0	2	3	-4	-9	-16	-18
	5	-4	-8	-9	-7	-13	-12	-13
	1	1	0	-2	-3	-4	0	2
	0,2	3	5	2	1	2	0	0
	0,04	13	7	4	3	2	2	0
	0		4	2	-1	1	0	0

Таблица 21. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 48-часовой обработки некомплементарным контролем

Превышение Loewe; Бал синергии = 0,41		Некомплементарный, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
АВТ-199, нМ	1000	-4	-4	-4	-7	-12	-15	-6
	500	5	0	7	6	-1	-7	-7
	100	5	9	6	6	0	-8	-11
	20	0	3	-1	-5	-7	-5	-8
	5	-4	-7	-6	-6	-8	-10	-6
	1	1	3	0	-1	-3	-2	-3
	0,2	3	6	3	0	0	-1	2
	0,04	13	8	6	2	2	-1	2
	0		6	-1	-2	-1	-2	1

График % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации АВТ-199 при различных концентрациях иметельстата натрия для 96-часовой обработки показан на фиг. 13. в табл. 22 показаны расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для каждой комбинации для клеток MOLM-13 после 96-часовой обработки. Значения больше нуля находятся в верхней правой диагонали табл. 19. Удивительно, что даже самые низкие концентрации АВТ-199 (0,04 и 0,2 нМ) демонстрируют синергизм с иметельстатом натрия при 50 и 75 мкМ иметельстата натрия соответственно, а самые низкие концентрации иметельстата натрия (1 и 5 мкМ) показывают синергизм с АВТ-199 при 500 и 100 нМ соответственно. Программное обеспечение Horizon Chalice™ Analyzer дополнительно предоставляет оценку синергии, причем значения больше 1 указывают на синергию. Для клеток, обработанных иметельстатом натрия, через 96 ч было установлено, что бал синергии составляет 11,33. Это по сравнению с балами 0,03 и 0,06 для неполностью комплементарного и некомплементарного контролей (табл. 23 и 24) соответственно. График % апоптотических клеток (двойное мечение) в зависимости от концентрации АВТ-199 при различных концентрациях иметельстата натрия для 96-часовой обработки показан на фиг. 14А и 14В для неполностью комплементарного и некомплементарного контролей соответственно.

Таблица 22. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки иметельстатом натрия

Превышение Loewe; Бал синергии = 11,33		Иметельстат натрия, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	1000	-1	5	26	61	71	65	61
	500	4	10	24	63	70	65	61
	100	0	3	12	38	70	64	61
	20	-7	-2	6	22	69	64	59
	5	-2	-3	-1	6	19	64	55
	1	1	6	0	-1	-1	38	56
	0,2	4	4	1	-2	-5	13	53
	0,04	9	9	6	0	-5	0	36
	0		6	3	-1	-5	-2	5

Таблица 23. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки неполностью комплементарным контролем

Превышение Loewe; Бал синергии = 0,33		Неполностью комплементарный, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	1000	-1	-2	-3	-6	-13	-12	-14
	500	4	-4	0	-5	-14	-12	-10
	100	0	-2	0	-3	-19	-9	-13
	20	-7	-3	-4	-4	-5	-7	-5
	5	-2	-6	-5	-6	-8	-6	1
	1	1	-1	-1	-3	-5	-2	2
	0,2	4	2	2	2	-1	1	3
	0,04	9	3	2	1	-1	-2	0
	0		1	0	-1	-2	-1	1

Таблица 24. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки некомплементарным контролем

Превышение Loewe; Бал синергии = 0,06		Некомплементарный, мкМ						
		0	1	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	1000	-1	4	-7	-9	-16	-21	-23
	500	4	3	-5	-10	-16	-21	-22
	100	0	-2	-4	-5	-10	-19	-19
	20	-7	-4	-2	-5	-3	-14	-17
	5	-2	0	-6	-4	-5	-5	-10
	1	1	3	0	-1	0	-2	-2
	0,2	4	1	0	-1	-2	-3	-1
	0,04	9	1	-1	1	1	-1	-4
	0		1	0	-1	-1	-1	1

Апоптотическая популяция (двойное мечение) через 96 ч после обработки одной дозой показана для MOLM-13 (фиг. 17A) и клеточной линии HL-60 ОМЛ (фиг. 17B). В данном эксперименте использовали меньший диапазон доз ABT-199 для оценки эффективности совместной с иметельстатом натрия обработки. в табл. 25 показаны расчеты превышения аддитивности (модель Loewe), рассчитанные с помощью программного обеспечения Horizon Chalice™ Analyzer для каждой комбинации MOLM-13, а в табл. 26 - для HL-60. Несмотря на синергизм в обеих линиях, более высокий синергизм наблюдается в MOLM-13, что подтверждается как более высоким балом, так и усиленным влиянием на апоптоз при более низких (5 и 10 мкМ) концентрациях иметельстата натрия. Комбинация с иметельстатом натрия демонстрирует перспективность с концентрациями ABT-199 вплоть до доз 1-5 нМ.

Таблица 25. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки одной дозой натрия имельтестата для MOLM-13

Превышение Loewe; Бал синергии = 3,24		Имельтестат натрия, мкМ					
		0	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	100	-1	10	30	62	69	69
	20	5	14	25	43	60	67
	5	-3	4	9	24	26	48
	1	0	3	5	9	12	15
	0,5	0	-1	0	3	2	5
	0	13	1	-2	1	1	0

Таблица 26. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки одной дозой натрия имельтестата для HL-60

Превышение Loewe; Бал синергии = 1,77		Имельтестат натрия, мкМ					
		0	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	100	0	1	7	29	46	63
	20	1	-4	-2	19	45	57
	5	0	-1	-2	9	33	49
	1	3	2	4	4	9	17
	0,5	3	2	2	0	2	7
	0	2	1	0	-3	-1	2

Для сравнения данные, представленные на фиг. 13 и использованные для создания табл. 22, повторно анализировали с помощью программного обеспечения Horizon Chalice™ Analyzer только для доз, использованных в фиг. 17А и табл. 25. Как указано в табл. 27, бал синергизма почти вдвое дальше (с 11,33 до 6,06) от верхних уровней кривой титрования ABT-199. Этот бал примерно в два раза больше того (6,06 против 3,24), что был получен после 96 ч в режиме с единичной дозой (табл. 25), что позволяет предположить, что большая синергия комбинирования ABT-199 с имельтестатом натрия индуцируется при непрерывном воздействии.

Таблица 27. Расчеты превышения аддитивности (модель Loewe) для 96-часовой обработки, с повторным дозированием на 48 для MOLM-13 (воссоздано из фиг. 13)

Превышение Loewe; Бал синергии = 6,06		Имельтестат натрия, мкМ					
		0	5	10	25	50	75
ABT-199, нМ	100	2	14	40	69	63	60
	20	-4	8	25	67	63	58
	5	0	1	8	18	63	53
	1	4	2	0	-2	37	54
	0,5		4	0	-6	-1	4
	0						

Пример 4. Ингибитор теломеразы имельтестат натрия в комбинации с BCL-2

Ингибитор венитоклакс усиливает апоптоз *ex vivo* в образцах пациентов с ОМЛ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) - это агрессивное онкологическое заболевание с ограниченными возможностями лечения помимо химиотерапии, поэтому являются необходимыми терапевтические агенты для удовлетворения этой неудовлетворенной потребности. Как hTERT, каталитическая субъединица теломеразы, так и BCL-2, регулятор апоптоза, сверхэкспрессируются при ОМЛ, коррелируя с тяжестью заболевания и плохим прогнозом соответственно. Имельтестат натрия является первым в своем классе конкурентным ингибитором теломеразы с клинической активностью при гематологических злокачественных новообразованиях. Венитоклакс (ABT-199), одобренный ингибитор BCL-2 для пациентов с ХЛЛ, которые имеют делецию 17p и которые проходили по меньшей мере одну предшествующую терапию, продемонстрировал многообещающую клиническую пользу для пациентов с ОМЛ.

Исследование в данном примере изучало влияние имельтестата натрия или венитоклакса отдельно, или в комбинации, на клетках ОМЛ *in vitro*.

Клеточные линии ОМЛ (см. пример 1) и образцы мононуклеарных клеток периферической крови пациентов ("МКПК"), которые были получены из цельной крови пациентов с ОМЛ после очистки фикоаллом (Ficoll), обрабатывали только имельтестатом натрия или венитоклаксом, или обоими в комбинации, и способом проточной цитометрии исследовали жизнеспособные и апоптотические популяции клеток. По механизму действия были исследованы теломеразная активность, экспрессия hTERT и митохондриальная дисфункция. МКПК пациентов с ОМЛ дозировали имельтестатом натрия (0, 25 и 50 мкМ), венитоклаксом (ABT-199) (0, 20 и 100 нМ) или их комбинацией в течение либо 16, либо 40 ч. Апоптоз измеряли с помощью проточной цитометрии, с окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия. Неокрашенные (т.е. дважды отрицательные) клетки представляют собой жизнеспособные клетки, остающиеся после обработки.

В частности, цельную кровь пациентов с ОМЛ ($n = 4$) очищали с использованием Ficoll-Paque Plus (№ 17-1440-03 каталога GE Healthcare), чтобы изолировать МКПК. Фиколл загружали в центрифужные пробирки SepMate емкостью 50 мл (№ 85450 каталога StemCell Technologies) и кровь пациента предварительно разводили фосфатно-солевым буфером (ФСБ; № 20012-027 каталога ThermoFisher) с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) с HyClone FBS (№ SH30070.02 каталога ThermoFisher) 1:1 перед загрузкой поверх фиколла. Кровь центрифугировали для отделения МКПК от эритроцитов, гранулоцитов и т.д., а оставшиеся МКПК дважды промывали ФСБ + 2% ФБС. Клетки высевали с плотностью около 300000 клеток/лунка в 96-луночные полистироловые U-дноподобные плашки для культивирования тканей (№ 353777 каталога Corning) в RPMI-1640 (№ 11875-085 каталога ThermoFisher) дополненной 10% HyClone FBS, упомянутой выше, и выращивали в инкубаторе с 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. С МКПК *ex vivo* антибиотики не использовались. Клетки тут же обрабатывали иметельстатом натрия (Janssen Biotech, Inc.), приготовленным в RPMI-1640, с добавлением 10% ФБС, и/или АВТ-199 (№ S8048 каталога Selleckchem), приготовленным в виде 1000-кратного стокового раствора в ДМСО, разведенного 1:100 в ФСБ (носитель). Иметельстат натрия был протестирован от 0 до 50 мкМ, и венитоклак (АВТ-199) был протестирован от 0 до 100 нМ.

После 16- и 40-часовой обработки клетки проверяли на наличие здоровых, раннеапоптотических и апоптотических популяций с помощью набора для анализа проточной цитометрией с аннексином V (окрашивает внутреннюю сторону клеточной мембраны) и йодидом пропидия (PI, ДНК-связывающий краситель) (№ 640914 каталога BioLegend), как описано в примере 1. Кроме того, МКПК окрашивали по следующим маркерам дифференцировки: CD45 (конъюгированный с V500; № 560777 каталога BD), и CD34 (конъюгированный с Pacific Blue; № 343512 каталога Biolegend). Результаты были собраны сначала для положительности по CD45, а затем для CD34, перед оценением с помощью аннексина V/йодида пропидия, как описано в примере 1 выше. Средние и стандартные отклонения были определены для четырех пациентов для популяций CD45⁺ (лейкоциты) и CD45⁺/CD34⁺ (лейкозные стволовые клетки).

Результаты обработок *ex vivo*

Фиг. 15A-15D демонстрируют средний ответ образцов МКПК четырех пациентов с ОМЛ, подвергавшихся *ex vivo* воздействию иметельстата натрия и/или венитоклакса (АВТ-199). Графики % жизнеспособных клеток после обработки в течение 16 ч для обработки лейкоцитов CD45⁺ и лейкозных стволовых клеток CD45⁺/CD34⁺ пациентов с ОМЛ различными концентрациями венитоклакса (АВТ-199) и/или иметельстата натрия показаны на фиг. 15A (лейкоциты CD45⁺) и 15B (лейкозные стволовые клетки CD45⁺/CD34⁺). Графики % жизнеспособных клеток после обработки в течение 40 ч для обработки лейкоцитов CD45⁺ и лейкозных стволовых клеток CD45⁺/CD34⁺ пациентов с ОМЛ различными концентрациями венитоклакса (АВТ-199) и/или иметельстата натрия показаны на фиг. 15C (лейкоциты CD45⁺) и 15D (лейкозные стволовые клетки CD45⁺/CD34⁺). В целом, как правило, на жизнеспособность лейкоцитов CD45⁺, полученных от пациентов с ОМЛ, обработка только иметельстатом натрия не влияла, и лишь в умеренной степени на неё влиял венитоклак в качестве одиночного агента после 16-часового и 40-часового воздействия. Однако при использовании иметельстата натрия в комбинации с венитоклаксом наблюдалось снижение жизнеспособности клеток. Аналогичные результаты наблюдали для популяции лейкозных стволовых клеток CD45⁺/CD34⁺; отмечали дозозависимую активность в виде снижения жизнеспособности клеток, когда иметельстат натрия применяли в комбинации с венитоклаксом, в оба контрольных момента времени, и она была наиболее сильной через 40 ч. Дозозависимая синергетическая активность в виде индукции апоптоза наблюдалась для множества клеточных линий ОМЛ, когда иметельстат натрия комбинировали с венитоклаксом (см. пример 1). Например, для клеточной линии MOLM-13 иметельстат натрия и венитоклак по отдельности обладали умеренным апоптотическим действием через 48 ч (22 и 30% соответственно), но в комбинации достигло 88% через 48 ч и почти 100% через 96 ч. Подобное усиление апоптотического действия наблюдали также в образцах четырех пациентов с ОМЛ. Молекулярный анализ показал, что комбинирование иметельстата натрия с венитоклаксом снижало экспрессию hTERT и активность теломеразы сильнее, чем каждый из этих препаратов по отдельности. Данный пример демонстрирует, что комбинация иметельстата натрия с венитоклаксом при ОМЛ оказывает синергетический эффект на индукцию апоптоза в клеточных линиях и образцах пациентов *in vitro*.

Пример 5. Ингибитор теломеразы иметельстат натрия в комбинации с ингибитором BCL-2 венитоклаксом повышает выживаемость *in vivo* при остром миелоидном лейкозе

Как обсуждалось в примере 4, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) - это агрессивное онкологическое заболевание с ограниченными возможностями лечения помимо химиотерапии, и, следовательно, являются необходимыми агенты, приводящие к выздоровлению. В примере 4 было продемонстрировано, что ингибитор теломеразы иметельстат натрия в комбинации с ингибитором BCL-2 венитоклаксом усиливает апоптоз *in vitro*. Исследование в данном примере изучало эффект иметельстата натрия или венитоклакса по отдельности, или в комбинации, в модели острого миелоидного лейкоза *in vivo*.

Способы

Чтобы оценить эффективность и выживаемость, было проведено исследование *in vivo* на мышинной модели MOLM-13 ОМЛ с диссеминированием. В частности, в сутки 0 исследования опухолевые клетки

MOLM-13 ОМЛ были имплантированы мышам. Мышей обрабатывали в течение 31 суток: (i) носителями (ММ+ПЭГ400/Phosal50/ЕТОН); (ii) иметельстатом натрия (30 мг/кг), (iii) венитоклаксом АВТ-199 (100 мг/кг), (iv) ММ (неполностью комплементарным олигонуклеотидным контролем) (30 мг/кг) и АВТ-199 (100 мг/кг); и (v) иметельстатом натрия (30 мг/кг) и АВТ-199 (100 мг/кг). Процент выживаемости мышей оценивали как функцию по времени (суток после имплантации опухолевых клеток). Исследование длилось в общей сложности 108 суток (77 суток после прекращения лечения).

Пятидесяти мышным самкам SCID-beige (6-недельного возраста, Jackson Laboratory) внутривенно вводили 1 миллион клеток MOLM-13 и разделили их случайным образом на пять групп. В первые сутки после инъекции мышей обрабатывали в любом из пяти режимов, перечисленных в табл. 28.

Таблица 28. Режим обработки мышей SCID-beige, инокулированных MOLM-13 в диссеминирующей модели ОМЛ

Группа	Лекарственное средство	Доза	n	Путь введения	Схема введения
1	Носители: ММ	30 мг/кг	10	ip	ТРН x 4 недели
	ПЭГ400, Phosal50, ЕТОН	...		po	qd (7x) x 4 недели
2	иметельстат натрия	30 мг/кг	10	ip	ТРН x 4 недели
3	венитоклакс (АВТ-199)	100 мг/кг	10	po	qd (7x) x 4 недели
4	ММ	30 мг/кг	10	ip	ТРН x 4 недели
	венитоклакс (АВТ-199)	100 мг/кг		po	qd (7x) x 4 недели
5	иметельстат натрия	30 мг/кг	10	ip	ТРН x 4 недели
	венитоклакс (АВТ-199)	100 мг/кг		po	qd (7x) x 4 недели

Сокращения: ip - внутрибрюшинно; po - перорально; ТРН - три раза в неделю; QD - один раз в сутки; мг/кг, миллиграмм препарата на килограмм массы животного

Мышей обследовали ежедневно, а массы тел измеряли два раза в неделю. Следили за выживанием мышей в каждой группе. Исследование было прекращено на 108-е сутки, то есть через 77 суток после последней обработки. Увеличенную продолжительность жизни ("УПЖ") оценивали для каждой группы, и % УПЖ по сравнению с контролем рассчитывали как:

$$\% \text{ УПЖ} = 100 \times (T-C)/C$$

где Т - медиана выживаемости обработанной группы, а С - медиана выживаемости контрольной группы.

Результаты исследования in vivo

График выживания Каплана-Мейера для MOLM-13 модели ОМЛ с диссеминированием в сутки 108 показан на фиг. 16. В частности, фиг. 16 показывает процент выживания мышей как функцию от суток после имплантации опухолевых клеток. Медиана выживаемости и % увеличенной продолжительности жизни ("УПЖ"), рассчитанные для различных групп лечения, показаны в табл. 29. Результаты показывают, что медианное время выживания для мышей, которым вводили иметельстат натрия в качестве единственного агента, составляло 26,5 суток, что соответствует 20,4% УПЖ ($p = 0,0009$) по сравнению с носителем. Лечение венитоклаксом (АВТ-199) в качестве единственного агента дало медианную выживаемость в 30 суток и 36,3% УПЖ ($p < 0,0001$). АВТ-199, в комбинации с неполностью комплементарным (ММ) олиго контролем, показал аналогичные для отдельно АВТ-199 эффекты: медианное время выживания составило 31 сутки и 40,9% УПЖ ($p < 0,0001$). Комбинация иметельстата натрия с АВТ-199 дала наилучший результат с медианным временем выживания, составляющим 37 суток, и значительной эффективностью в 68,1% УПЖ ($p < 0,0001$). Кроме того, четыре мыши (40%) из этой группы комбинированного лечения жили долго и дожили до более чем 108 суток, демонстрируя полезное увеличение выживаемости.

Таблица 29. Медианное время выживания и процент увеличения продолжительности жизни (% УПЖ; по сравнению с контролем) мышей с имплантированными MOLM-13, получавших иметельстат натрия и/или венитоклак (ABT-199), или ММ (неполностью совпадающий олигонуклеотидный контроль)

Группа	Медианное выживание (сутки)	% УПЖ	P
Носители: ММ	22	—	—
иметельстат натрия	26,5	20,4	0,0009
ABT-199	30	36,3	0,0001
ММ+ABT-199	31	40,9	0,0001
иметельстат натрия+ABT-199	37	68,1	0,0001

Все мыши переносили комбинацию иметельстата натрия с венитоклаксом, и наблюдалась увеличенная продолжительность жизни по сравнению с только иметельстатом натрия (39,6%, $p = 0,0011$) или с только венитоклаксом (23,3%, $p = 0,0001$).

В группе комбинации 40% обработанных мышей были живы через 77 суток после прекращения лечения, демонстрируя значительное преимущество в выживании с потенциальным излечением. Результаты данного примера, а также примера 4 демонстрируют, что комбинация иметельстата натрия с венитоклаксом при ОМЛ оказывает синергетический эффект на индукцию апоптоза в клеточных линиях и образцах пациентов *in vitro*, что трансформируется в продленную выживаемость и потенциальное излечение в ксенотрансплантатных моделях.

Эквиваленты и включение по ссылке

Хотя данное изобретение было описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть внесены различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от объема изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций, чтобы адаптировать конкретное состояние, материал, состав вещества, процесс, этап или этапы процесса для достижения преимуществ, обеспечиваемых данным изобретением, не выходя за рамки объема данного изобретения. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации и патентные документы, процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были специально и отдельно указаны для включения в данный документ посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предназначено для указания того, что любой такой документ относится к предшествующему уровню техники, и не представляет собой какое-либо допущение относительно его содержания или даты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения острого миелоидного лейкоза, включающий в себя введение иметельстата и ABT-199 субъекту с острым миелоидным лейкозом.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что иметельстат представляет собой иметельстат натрия.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что иметельстат вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, причем каждый цикл включает в себя:
 - (a) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели;
 - (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; или
 - (c) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или
 - (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели.
4. Способ по пп.1-3, отличающийся тем, что ABT-199 вводят в дозе:
 - (a) 50-400 мг ABT-199 ежедневно;
 - (b) 2 мг ABT-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно или
 - (c) 25 мг ABT-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно.
5. Способ по пп.1-4, отличающийся тем, что введение ABT-199 осуществляют за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат.
6. Применение иметельстата или иметельстата натрия для лечения острого миелоидного лейкоза у пациента, проходящего лечение ABT-199 или его фармацевтически приемлемой солью.
7. Применение ABT-199 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения острого миелоидного лейкоза у пациента, проходящего лечение иметельстатом или иметельстатом натрия.

8. Применение по пп.6, 7, при этом иметельстат представляет собой иметельстат натрия.
9. Применение по пп.6-8, причем иметельстат вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, при этом каждый цикл включает в себя:
 - (a) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели;
 - (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель;
 - (c) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели или
 - (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели.
10. Применение по пп.6-9, причем АВТ-199 предназначен для введения в дозе:
 - (a) 50-400 мг АВТ-199 ежедневно;
 - (b) 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно или
 - (c) 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно.
11. Применение по пп.6-10, причем введение АВТ-199 возможно за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат.
12. Применение комбинации, содержащей иметельстат и АВТ-199, для лечения у пациента острого миелоидного лейкоза.
13. Применение по пп.6-12, при этом иметельстат представляет собой иметельстат натрия.
14. Применение по пп.12, 13, причем иметельстат вводят в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше чем 8 циклов дозирования, при этом каждый цикл включает в себя:
 - (a) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели;
 - (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата один раз в неделю в течение четырех недель; или
 - (c) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата один раз в три недели; или
 - (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата один раз в четыре недели.
15. Применение по пп.12-14, причем АВТ-199 предназначен для введения в дозе:
 - (a) 50-400 мг АВТ-199 ежедневно;
 - (b) 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно или
 - (c) 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно.
16. Применение по пп.12-15, причем введение АВТ-199 возможно за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат.
17. Применение по пп.12, 13, причем комбинация представляет собой фармацевтическую композицию.
18. Применение иметельстата и АВТ-199 при приготовлении лекарственного средства для лечения острого миелоидного лейкоза.
19. Применение по п.16, причем иметельстат представляет собой иметельстат натрия.
20. Применение по пп.12-15, причем комбинация иметельстата и АВТ-199 индуцирует апоптоз клеток острого миелоидного лейкоза.
21. Применение иметельстата натрия для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающее в себя введение иметельстата натрия и АВТ-199 в комбинации субъекту, нуждающемуся в этом.
22. Применение АВТ-199 для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающее в себя введение комбинации АВТ-199 и иметельстата натрия субъекту, нуждающемуся в этом.
23. Применение по любому из пп.21, 22, причем иметельстат натрия предназначен для введения в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый цикл включает в себя:
 - (a) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия один раз в четыре недели;
 - (b) внутривенное введение около 7-10 мг/кг иметельстата натрия один раз в неделю в течение четырех недель;
 - (c) внутривенное введение около 2,5-7 мг/кг иметельстата натрия один раз в три недели или
 - (d) внутривенное введение около 0,5-9,4 мг/кг иметельстата натрия один раз в четыре недели.
24. Применение по любому из пп.21-23, причем АВТ-199 предназначен для введения в дозе:
 - (a) около 50-400 мг АВТ-199 ежедневно;
 - (b) около 2 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы около 800 мг на 6-е сутки и после этого ежедневно или
 - (c) около 25 мг АВТ-199 на 1-е сутки с ежедневным увеличением до конечной дозы около 400 мг на 5-е сутки и после этого ежедневно.
25. Применение по любому из пп.21-24, причем введение АВТ-199 осуществляют за одни сутки до, через одни сутки после или в те же сутки, когда вводят иметельстат натрия.
26. Способ *in vitro* индукции апоптоза в клетке острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), включающий приведение в контакт клетки с терапевтически эффективным количеством иметельстата и приведение в

контакт клетки с терапевтически эффективным количеством АВТ-199.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

28. Набор для лечения острого миелоидного лейкоза, содержащий:

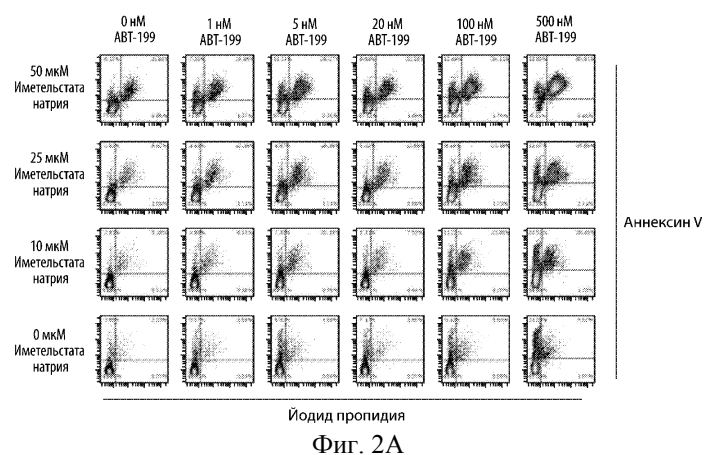
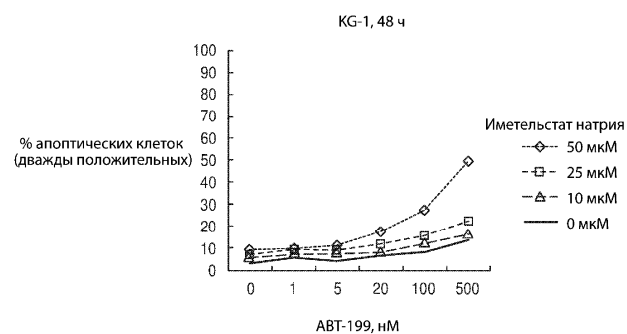
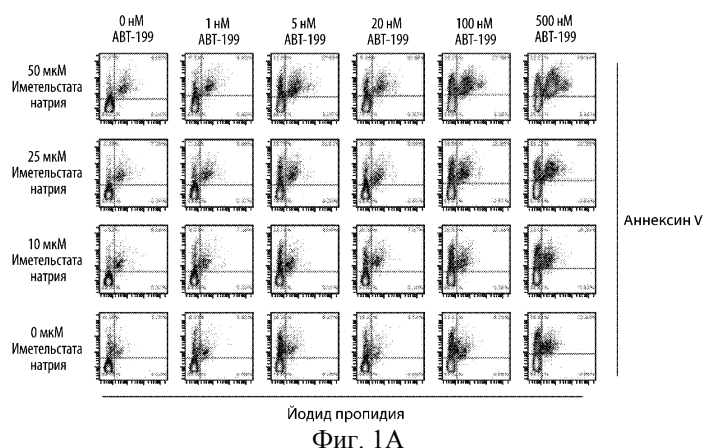
(а) дозу иметельстата в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза клеток острого миелоидного лейкоза;

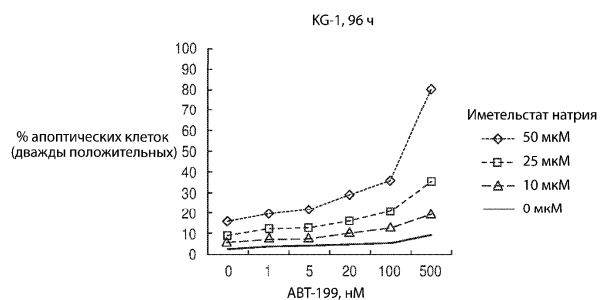
(б) дозу АВТ-199 или его фармацевтически приемлемой соли в количестве, эффективном при введении для индукции апоптоза клеток острого миелоидного лейкоза.

29. Набор по п.28, отличающийся тем, что иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

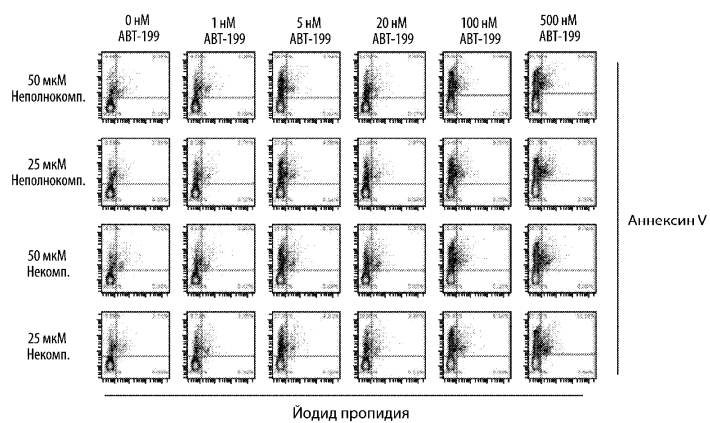
30. Фармацевтическая композиция для лечения острого миелоидного лейкоза, содержащая иметельстат и АВТ-199.

31. Фармацевтическая композиция по п.30, отличающаяся тем, что иметельстат представляет собой иметельстат натрия.

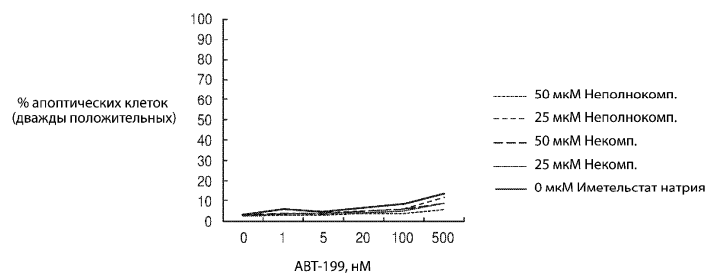




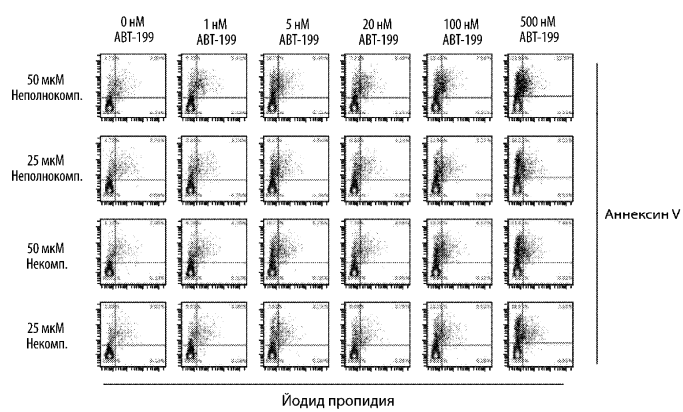
Фиг. 2В



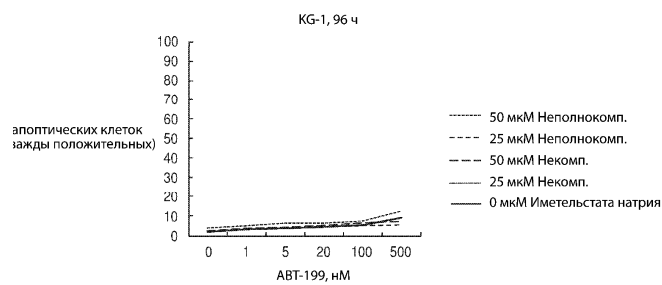
Фиг. 3А



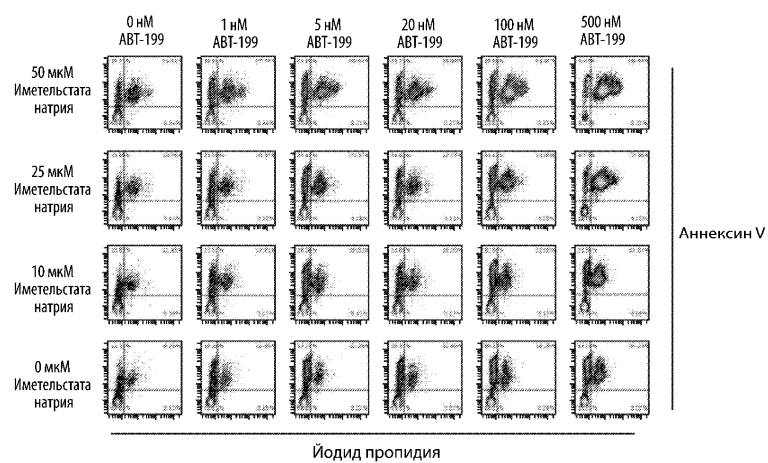
Фиг. 3В



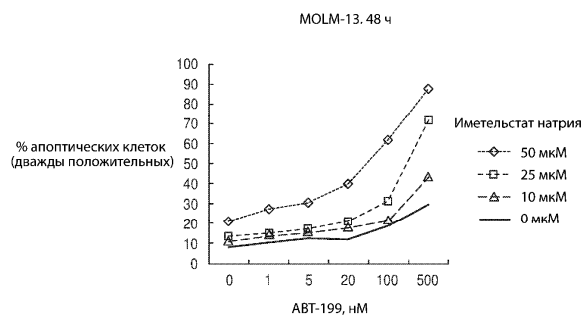
Фиг. 4А



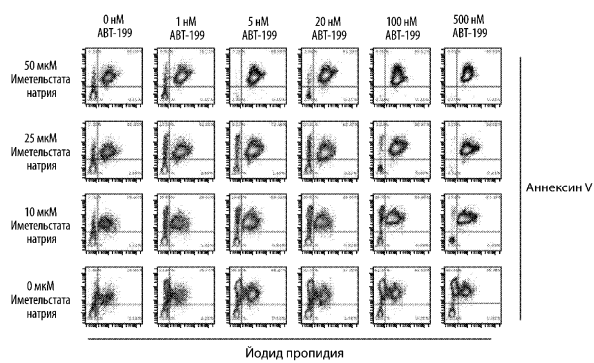
Фиг. 4В



Фиг. 5А

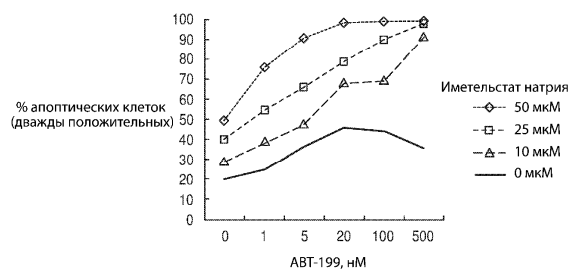


Фиг. 5В

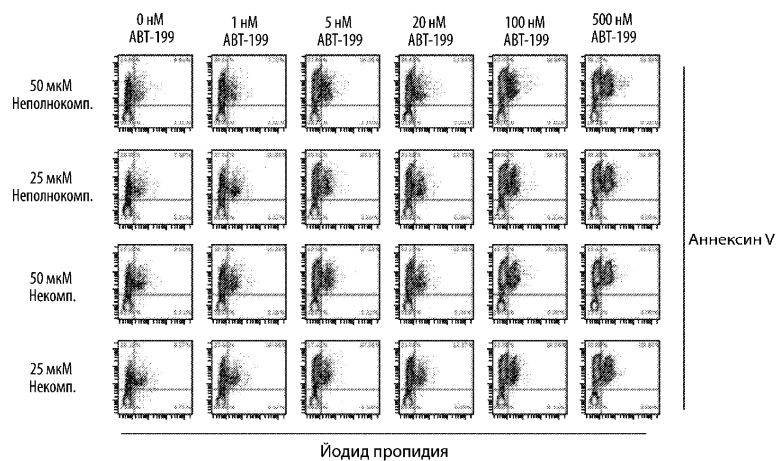


Фиг. 6А

MOLM-13, 96 ч

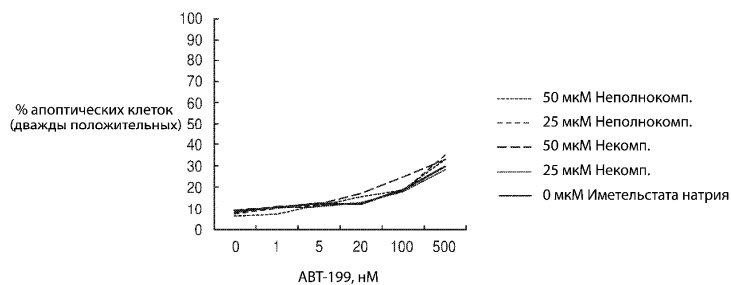


Фиг. 6В

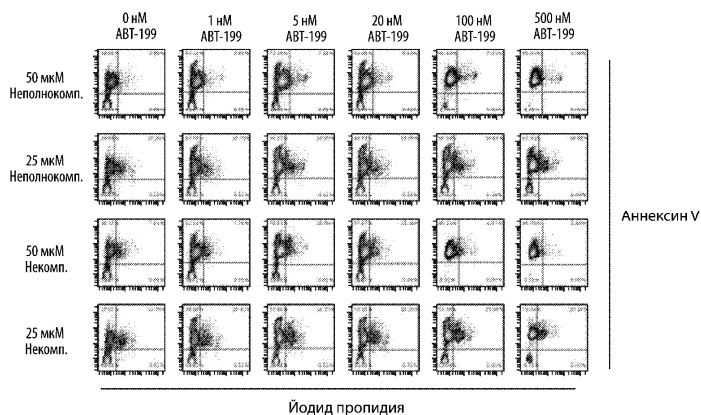


Фиг. 7А

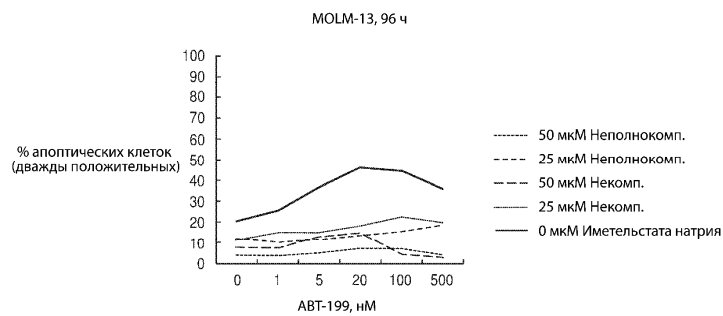
MOLM-13, 48 ч



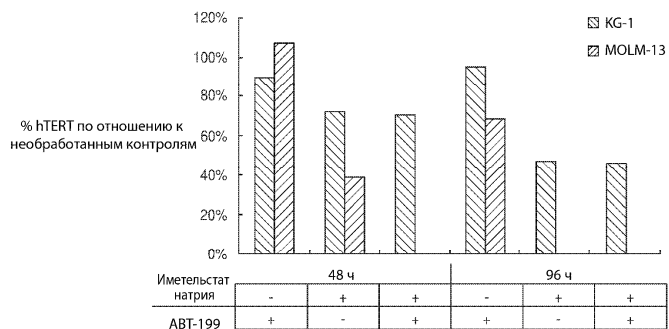
Фиг. 7В



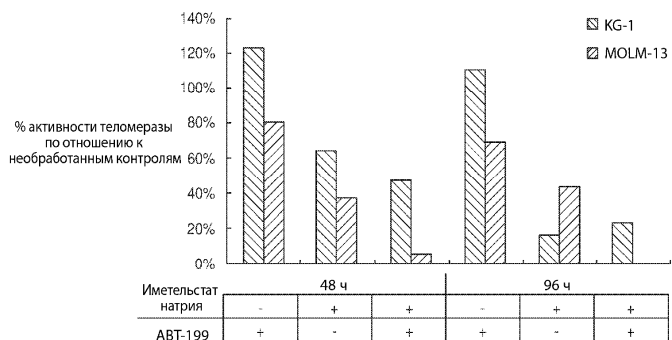
Фиг. 8А



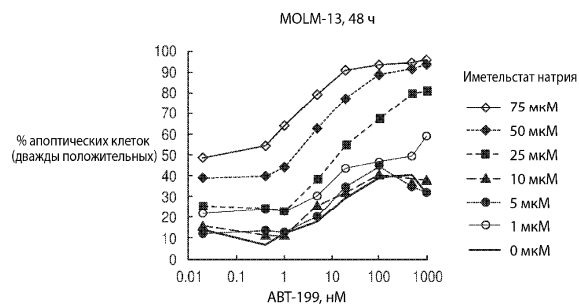
Фиг. 8В



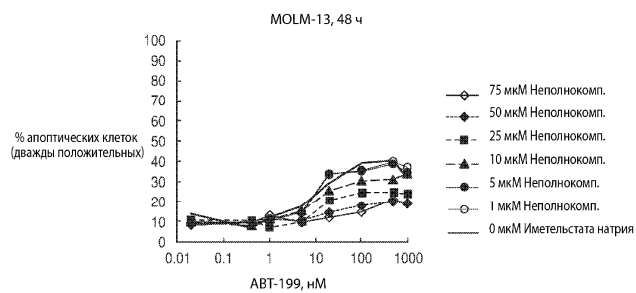
Фиг. 9



Фиг. 10

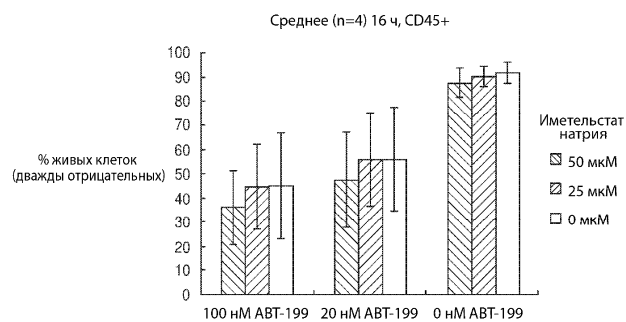
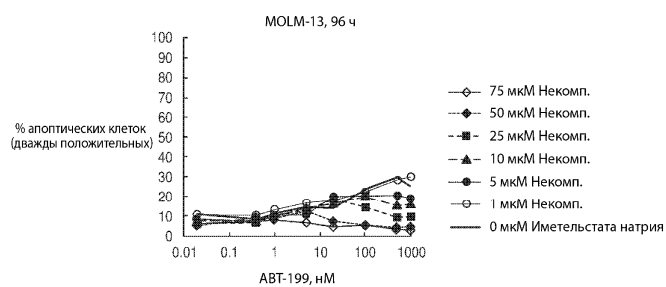
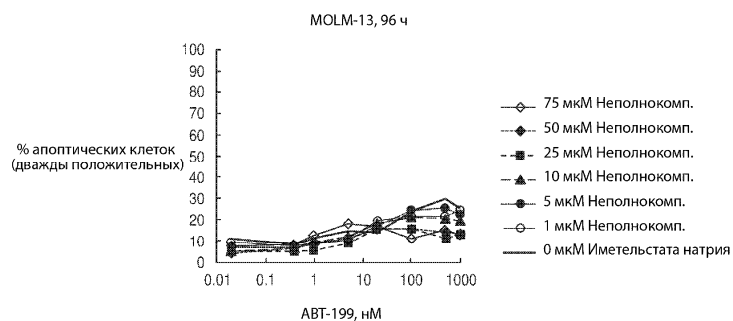
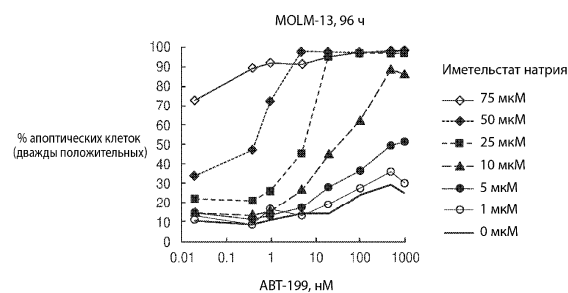
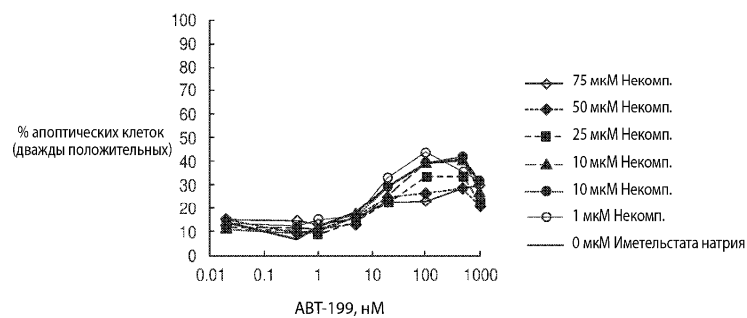


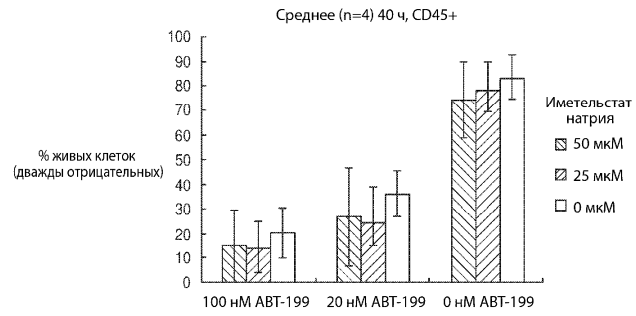
Фиг. 11



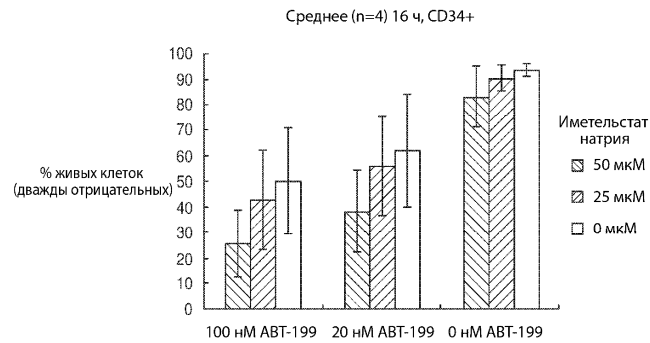
Фиг. 12А

MOLM-13, 48 ч

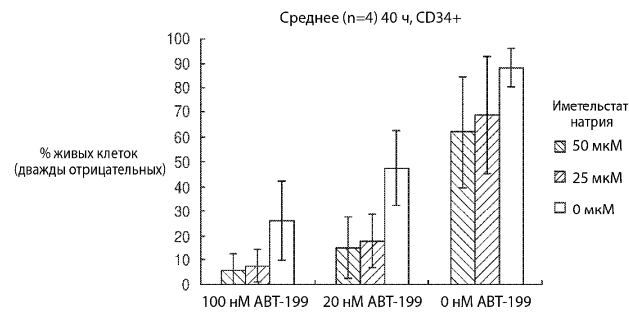




Фиг. 15B

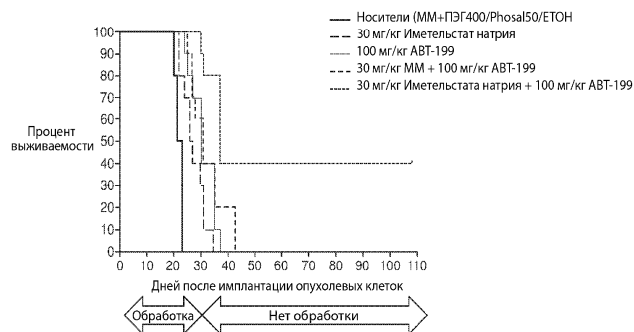


Фиг. 15C

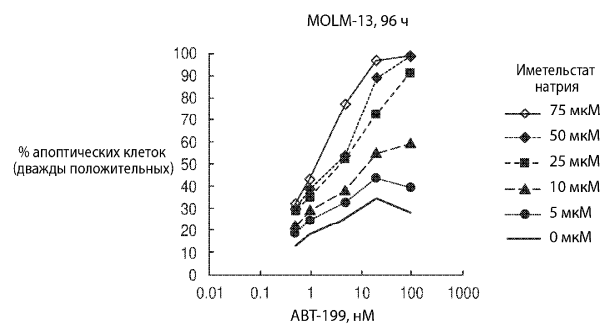


Фиг. 15D

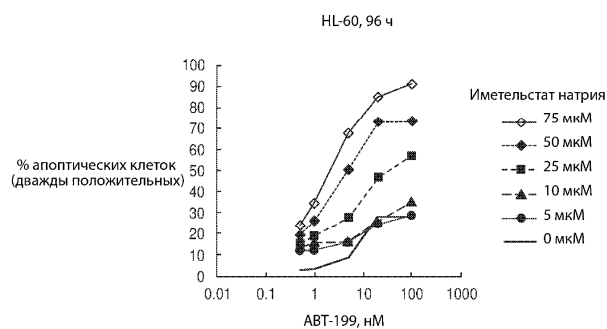
График выживаемости Каплана-Маера в MOLM-13 диссеминированной модели ОМЛ на 108-й день



Фиг. 16



Фиг. 17А



Фиг. 17В

