

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041953**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.12.19**

(21) Номер заявки  
**201990737**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.15**

(51) Int. Cl. *A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/711* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

---

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫМИ АНТИСМЫСЛОВЫМИ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ**

---

(31) **62/395,680; 62/487,277**

(32) **2016.09.16; 2017.04.19**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/051723**

(87) **WO 2018/053232 2018.03.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙО-ПАТ ХОЛДИНГЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Асидзава Ана Тари (US)**

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

(56) US-A1-20070238686  
US-A1-20110250209

---

(57) В данном изобретении предлагаются способы лечения рака у пациента, включающие введение эффективного количества нуклеазо-устойчивого полинуклеотида, который гибридизуется с сайтом инициации трансляции нуклеиновой кислоты Grb2 у пациента, и либо ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl (например, дазатиниба) или аналога цитидина (например, децитабина или цитарабина). Рак может представлять собой Ph<sup>+</sup>, и/или Bcr-Abl-положительный хронический миелогенный лейкоз, или острый миелоидный лейкоз, или миелодиспластический синдром.

**041953**

**B1**

**041953**  
**B1**

Данная заявка заявляет приоритетное преимущество предварительных заявок США номер 62/487277, поданной 19 апреля 2017 года, и 62/395680, поданной 16 сентября 2016 года, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

#### **Область техники**

1) Область техники, к которой относится изобретение.

Данное изобретение относится в целом к области медицины.

Более конкретно, оно касается лечения рака с помощью комбинированной терапии, содержащей антисмысловые олигонуклеотиды, направленные на Grb2.

2) Описание предшествующего уровня техники.

По оценкам Американского онкологического общества, в 2015 году в США насчитывалось около 6600 пациентов с новым диагнозом хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ) и около 1140 смертей от ХМЛ. Средний возраст при постановке диагноза ХМЛ составляет около 64 лет. Почти половина случаев диагностируется у людей в возрасте 65 лет и старше. Этот тип лейкемии в основном поражает взрослых и редко встречается у детей. ХМЛ дифференцируется на хроническую, акселерационную и бластную фазы. У большинства пациентов с ХМЛ диагностируется хроническая фаза заболевания. Если пациенты с ХМЛ в хронической фазе не лечатся, они могут быстро перейти к акселерационной и бластной фазам (БФ) заболевания.

Филадельфийская хромосома (Ph) присутствует у 90-95% пациентов с ХМЛ. Это происходит в результате транслокации хромосом 9 и 22, которая размещает ген *abl* на 3'-конце гена *bcr*. Эта генетическая перестройка присутствует у всех пациентов, даже у тех, у которых стандартный кариотип не обнаруживает Ph-хромосому. Эта хромосомная транслокация продуцирует химерный ген, который экспрессируется в виде слитого белка p210Bcr-Abl в клетках Ph+ХМЛ. Слитый белок Bcr-Abl обладает дерегулированной активностью тирозинкиназы, что приводит к активации путей передачи сигналов RAS и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), что приводит к злокачественной трансформации клеток Ph+, пролиферации и выживанию.

Препараты, известные как ингибиторы тирозинкиназы, которые нацелены на слитый белок Bcr-Abl, являются стандартным лечением для пациентов с ХМЛ. Это происходит потому, что подавление активности тирозинкиназы Bcr-Abl снижает пролиферацию и выживание Ph+ клеток. Иматиниб (Gleevec®), ингибитор тирозинкиназы первого поколения, является стандартным средством лечения пациентов с ХМЛ в хронической фазе и фазе акселерации. Однако пациенты с ХМЛ в бластной фазе не реагируют на иматиниб. Кроме того, устойчивость к иматинибу наблюдается у некоторых пациентов с хронической фазой или ХМЛ фазы акселерации. Ингибитор тирозинкиназы второго поколения (например, дазатиниб (Das)) обычно назначают пациентам с ХМЛ, которые не переносят иматиниб или устойчивы к иматинибу. Но пациенты с ХМЛ не будут реагировать на иматиниб или ингибиторы тирозинкиназы второго поколения, если слитый белок Bcr-Abl принимает мутацию гена T315I. Существует необходимость в разработке более эффективных способов лечения для пациентов с ХМЛ, находящихся в фазе акселерации или бластной фазе, или устойчивых к ингибиторам тирозинкиназы.

#### **Краткое изложение изобретения**

В одном варианте осуществления изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту эффективного количества первой фармацевтической терапии, содержащей устойчивый к нуклеазе полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2 у пациента, и второй фармацевтической терапии, содержащей ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl. В некоторых аспектах, в данном документе предлагаются композиции для применения в лечении рака у пациента, нуждающегося в этом, причем указанные композиции содержат первую фармацевтическую терапию, содержащую устойчивый к нуклеазе полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2 у пациента, и второй фармацевтической терапии, содержащей ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl.

В некоторых аспектах полинуклеотид гибридизуется с сайтом инициации трансляции нуклеиновой кислоты Grb2. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой олигонуклеотид, имеющий длину 8-50 оснований. В некоторых аспектах полинуклеотид имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит Р-этоксид связи остова.

В некоторых аспектах полинуклеотид инкапсулирован в липосому. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия дополнительно содержит нейтральный липид. В некоторых аспектах первой фармацевтической терапией является BP1001. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия вводится системно. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия предназначена для внутриартериального или внутривенного введения. В некоторых аспектах первую фармацевтическую терапию вводят в дозировке от около 60 мг/м<sup>2</sup> до около 90 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых аспектах первую фармацевтическую терапию вводят два-четыре раза в неделю.

В некоторых аспектах ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl представляет собой дазатиниб, иматиниб, нилотиниб, бозутиниб, понатиниб или бафетиниб. В одном аспекте ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl представляет собой дазатиниб. В некоторых аспектах дазатиниб вводят в дозировке около 140 мг. В некоторых аспектах дазатиниб вводят один раз в день.

В некоторых аспектах вторая фармацевтическая терапия вводится системно. В некоторых аспектах вторую фармацевтическую терапию вводят перорально, внутривенно или внутримышечно. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия вводится до введения второй фармацевтической терапии.

В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия и вторая фармацевтическая терапия вводятся одновременно. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия и вторая фармацевтическая терапия вводятся различными путями.

В некоторых аспектах пациент является человеком. В некоторых аспектах пациент ранее безрезультатно лечился иматинибом.

В некоторых аспектах рак представляет собой колоректальный рак, нейробластома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак легкого, рак желудка, рак крови, рак кожи, рак яичка, рак предстательной железы, рак яичника, рак печени или рак пищевода, рак шейки матки, рак головы и шеи, немеланомный рак кожи или глиобластома. В некоторых аспектах рак представляет собой рак крови. В некоторых аспектах рак крови представляет собой хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС). В некоторых аспектах ХМЛ является ХМЛ акселерационной фазы или ХМЛ бластной фазы. В некоторых аспектах ХМЛ или ОМЛ представляет собой Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ. В некоторых аспектах Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ является положительным по мутации T315I Vcr-Abl. В некоторых аспектах ХМЛ или ОМЛ представляет собой положительный по филадельфийской хромосоме ХМЛ или положительный по филадельфийской хромосоме ОМЛ.

В одном варианте осуществления изобретения, в данном документе предлагаются способы лечения рака или миелодиспластического синдрома (МДС) у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту эффективного количества первой фармацевтической терапии, содержащей устойчивый к нуклеазе полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2, и второй фармацевтической терапии, содержащей аналог цитидина. В некоторых аспектах в данном изобретении предлагаются композиции для применения при лечении рака или миелодиспластического синдрома (МДС) у пациента, нуждающегося в этом, причем указанные композиции содержат эффективное количество первой фармацевтической терапии, содержащей устойчивый к нуклеазе полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2, и второй фармацевтической терапии, содержащей аналог цитидина.

В некоторых аспектах полинуклеотид гибридизуется с сайтом инициации трансляции нуклеиновой кислоты Grb2. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой олигонуклеотид, имеющий длину 8-50 оснований. В некоторых аспектах полинуклеотид имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит Р-этокси связи остова.

В некоторых аспектах полинуклеотид инкапсулирован в липосому. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия дополнительно содержит нейтральный липид. В некоторых аспектах первой фармацевтической терапией является ВР1001. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия вводится системно. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия предназначена для внутривенного или внутримышечного введения. В некоторых аспектах первую фармацевтическую терапию вводят в дозировке от около 60 мг/м<sup>2</sup> до около 90 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых аспектах первую фармацевтическую терапию вводят два-четыре раза в неделю.

В некоторых аспектах аналог цитидина представляет собой децитабин, цитарабин или азацитидин. В одном аспекте аналог цитидина представляет собой децитабин. В одном аспекте аналогом цитидина является цитарабин. В некоторых аспектах цитарабин вводят в дозе около 20 мг. В некоторых аспектах цитарабин вводят два раза в день. В некоторых аспектах цитарабин вводят подкожно.

В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия вводится до введения второй фармацевтической терапии. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия и вторая фармацевтическая терапия вводятся одновременно. В некоторых аспектах вторую фармацевтическую терапию вводят до введения первой фармацевтической терапии. В некоторых аспектах первая фармацевтическая терапия и вторая фармацевтическая терапия вводятся различными путями.

В некоторых аспектах пациент является человеком.

В некоторых аспектах рак представляет собой колоректальный рак, нейробластома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак легкого, рак желудка, рак крови, рак кожи, рак яичка, рак предстательной железы, рак яичника, рак печени или рак пищевода, рак шейки матки, рак головы и шеи, немеланомный рак кожи или глиобластома. В некоторых аспектах рак представляет собой рак крови. В некоторых аспектах рак крови представляет собой хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС). В некоторых аспектах ХМЛ является ХМЛ акселерационной фазы или ХМЛ бластной фазы. В некоторых аспектах ХМЛ или ОМЛ представляет собой Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ. В некоторых аспектах Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ является положительным по мутации T315I Vcr-Abl. В некоторых аспектах ХМЛ или ОМЛ представляет собой положительный по филадельфийской хромосоме ХМЛ или положительный по филадельфийской хромосоме ОМЛ.

В одном варианте осуществления изобретения, предложены композиции, содержащие популяцию олигонуклеотидов, которые гибридизуются с полинуклеотидным генным продуктом GRB2. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции состоят из нуклеозидных молекул, связанных вместе через связи фосфатного остова, причем по меньшей мере одна из связей фосфатного остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой Р-этоксид связи остова, и причем не более 80% связи фосфатного остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксид связи остова. В некоторых аспектах по меньшей мере одна из связей фосфатного остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой связь фосфодиэфирного остова. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 1. В различных аспектах олигонуклеотиды популяции ингибируют экспрессию белка Grb2. В некоторых аспектах композиция лиофилизирована.

В некоторых аспектах от 10 до 80% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова; от 20 до 80% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова; от 30 до 80% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова; от 40 до 80% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова; от 50 до 80% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова; или от 60 до 70% связей фосфатного остова представляют собой Р-этоксид связи остова или любой получаемый в них диапазон. В некоторых аспектах от 20 до 90% связей фосфатного остова представляют собой фосфатные связи остова; от 20 до 80% связей фосфатного остова представляют собой фосфатные связи остова; от 20 до 70% связей фосфатного остова представляют собой фосфатные связи остова; от 20 до 60% связей фосфатного остова представляют собой фосфатные связи остова; от 20 до 50% связей фосфатного остова представляют собой фосфатные связи остова; или от 30 до 40% связей фосфатного остова представляют собой связи фосфатные связи остова или любой получаемый в них диапазон. В различных аспектах, по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или любое значение в них фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксид связи остова. В различных аспектах самое большее 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% или любое значение в них фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова. В определенных аспектах, фосфодиэфирные связи остова распределены по олигонуклеотидам. Как таковые, олигонуклеотиды не являются химерными молекулами. В некоторых аспектах олигонуклеотиды не содержат фосфоротиоатной связи остова.

В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер в диапазоне от 7 до 30 нуклеотидов. В определенных аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер в пределах от 12 до 25 нуклеотидов. В различных аспектах олигонуклеотиды популяции имеют размер по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. Диапазон размеров может быть средним размером олигонуклеотидов в популяции.

В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, где не более 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, соответственно, связей фосфатного остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой Р-этоксид связи остова. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, где по меньшей мере 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6, 6 или 6, соответственно, связей фосфатного остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой фосфодиэфирную связь остова.

В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов содержит один вид олигонуклеотидов. В других аспектах популяция олигонуклеотидов содержит по меньшей мере два вида олигонуклеотидов. Один вид олигонуклеотида может иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, но иметь или не иметь Р-этоксид связей в разных положениях в молекуле. Таким образом, популяция может быть гомогенной по нуклеотидной последовательности и гетерогенной по распределению фосфодиэфирных связей остова среди олигонуклеотидов популяции. Кроме того, популяция может быть гетерогенной по количеству Р-этоксид связей остова и фосфодиэфирных связей остова среди олигонуклеотидов популяции. В качестве неограничивающего примера, первая часть олигонуклеотидов в популяции может иметь 70% Р-этоксид связей и 30% фосфодиэфирных связей, тогда как вторая часть олигонуклеотидов в популяции может иметь 60% Р-этоксид связей и 40% фосфодиэфирных связей. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов содержит антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК (миРНК) или piwiРНК (пиРНК).

В различных аспектах композиция дополнительно содержит фосфолипиды. В некоторых аспектах фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют в молярном соотношении от около 5:1 до около 100:1. В некоторых аспектах олигонуклеотиды и фосфолипиды образуют олигонуклеотид-липидный комплекс, такой как, например, липосомный комплекс. В некоторых аспектах, по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% липосом имеют диаметр менее чем 5 микрон. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов включена в популяцию липосом.

В некоторых аспектах фосфолипиды являются незаряженными или имеют нейтральный заряд при физиологическом рН. В некоторых аспектах фосфолипиды представляют собой нейтральные фосфолипиды. В определенных аспектах нейтральные фосфолипиды представляют собой фосфатидилхолины. В

определенных аспектах нейтральные фосфолипиды представляют собой диолеилфосфатидилхолин. В некоторых аспектах фосфолипиды по существу не содержат холестерина.

В одном варианте осуществления изобретения, предложены фармацевтические композиции, содержащие композицию олигонуклеотидов и фосфолипидов по данным вариантам осуществления изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит химиотерапевтический агент.

В одном варианте осуществления изобретения, предложены способы снижения уровня экспрессии белка Grb2 в клетке, включающие приведение в контакт клетки с олигонуклеотидной композицией по данному варианту осуществления изобретения. В некоторых аспектах клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых аспектах клетка представляет собой раковую клетку.

В одном варианте осуществления изобретения, предложены способы доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, включающие приведение в контакт клетки с фармацевтической композицией по данному варианту осуществления изобретения. В некоторых аспектах способ представляет собой способ лечения гиперплазии, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

В одном варианте осуществления изобретения, предложены способы лечения субъекта больного раком, аутоиммунным заболеванием или инфекционным заболеванием, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по данному варианту реализации изобретения. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека. В некоторых аспектах рак представляет собой рак мочевого пузыря, крови, лимфому, рак поджелудочной железы, костей, костного мозга, мозга, груди, толстого кишечника, пищевода, желудка, головы и шеи, почек, печени, легкого, простаты, кожи, яичка, языка, яичника или рак матки. Опухоли, поддающиеся лечению способами по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, меланому, рак предстательной железы, рак яичников, рак груди, рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, папиллярный почечно-клеточный рак, рак желчного пузыря, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак толстой кишки, глиому, астроцитому, классическую лимфому Ходжкина и опухоли гладких мышц, а также клетки глиобластомы, стволовые клетки костного мозга, гемопоэтические клетки, остеобласты, эпителиальные клетки, фибробласты, а также любые другие опухолевые клетки, которые подвергаются апоптозу и вызывают устойчивость или регрессию опухолевых клеток. В некоторых аспектах аутоиммунное заболевание представляет собой красную волчанку, спондилоартропатию, болезнь Шегрена, болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз или ревматоидный артрит. В некоторых аспектах инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию или паразитарную инфекцию. В некоторых аспектах композицию вводят подкожно, внутривенно или внутривнутри. В некоторых аспектах способ дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере второй противораковой терапии. В некоторых аспектах вторая противораковая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормонотерапию, иммунотерапию или терапию цитокинами. В некоторых аспектах введение композиции снижает экспрессию белка Grb2 у пациента.

"Захватывать", "инкапсулировать" и "включать" относятся к липиду или липосоме, образующим препятствие для свободной диффузии в раствор в результате ассоциации с или вокруг интересующего агента, например, липосома может инкапсулировать агент в липидном слое или в водном компартменте внутри или между липидными слоями. В определенных вариантах осуществления изобретения, композиция содержится в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтически приемлемый носитель может быть составлен для введения человеку или пациенту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, липидный компонент имеет по существу нейтральный заряд, поскольку он содержит нейтральный фосфолипид или чистый нейтральный заряд. В некоторых аспектах нейтральный фосфолипид может представлять собой фосфатидилхолин, такой как DOPC, яичный фосфатидилхолин ("EPC"), дилауроилфосфатидилхолин ("DLPC"), димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), диолеоилфосфатидилхолин, 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диейкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("MPPC"), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин ("PMPC"), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин ("PSPC"), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("SPPC"), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин ("POPC"), 1-олеоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("OPPC") или лизофосфатидилхолин. В других аспектах нейтральный фосфолипид может быть фосфатидилэтаноламин, такие как диолеоилфосфатидилэтаноламин ("DOPE"), дистеароилфосфатидилэтаноламин ("DSPPE"), димиристоил фосфатидилэтаноламин ("DMPE"), дипальмитоил фосфатидилэтаноламин ("DPPE"), пальмитоилолеил фосфатидилэтаноламин ("POPE") или лизофосфатидилэтаноламин. В определенных вариантах осуществления изобретения, фосфолипидный компонент может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более видов или типов нейтрального фосфолипида. В других вариантах осуществления изобретения, фосфолипидный компонент может содержать 2, 3, 4, 5, 6 или более видов или типов нейтральных фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, липидный компонент может иметь по существу нейтральный заряд, поскольку он содержит положительно заряженный липид и отрицательно заряженный липид. Липидный компонент может дополнительно содержать нейтрально заряженный липид(ы) или фосфолипид(ы).

Положительно заряженный липид может быть положительно заряженным фосфолипидом. Отрицательно заряженный липид может быть отрицательно заряженным фосфолипидом. Отрицательно заряженный фосфолипид может представлять собой фосфатидилсерин, такой как димиристоилфосфатидилсерин ("DMPS"), дипальмитоилфосфатидилсерин ("DPPS") или фосфатидилсерин мозга ("BPS"). Отрицательно заряженный фосфолипид может быть фосфатидилглицерином, такие как дилауроилфосфатидилглицерин ("DLPG"), димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерин ("DSPG"), или диолеилфосфатидилглицерин ("DOPG"). В определенных вариантах осуществления изобретения, композиция дополнительно содержит холестерин или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В других вариантах осуществления изобретения, композиция по существу не содержит холестерин. В определенных вариантах осуществления изобретения, фосфолипид представляет собой природный фосфолипид. В других вариантах осуществления изобретения, фосфолипид представляет собой синтетический фосфолипид.

Липосомы могут быть изготовлены из одного или более фосфолипидов при условии, что липидный материал практически не заряжен. Важно, чтобы композиция по существу не содержала анионных и катионных фосфолипидов и холестерина. Подходящие фосфолипиды включают фосфатидилхолины и другие, которые хорошо известны специалистам в данной области.

Используемый в данном документе, термин "по существу свободный" в терминах определенного компонента используется в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно составлен в композицию и/или присутствует только в качестве загрязнителя или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного загрязнения композиции значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой никакое количество указанного компонента не может быть обнаружено стандартными аналитическими способами.

Как используется в данном документе, формы единственного числа могут обозначать и множественное число. Как используется в данном документе в формуле (пунктах формулы) изобретения, при использовании в сочетании со словом "содержащий", формы единственного числа могут обозначать и множественное число.

Использование термина "или" в формуле изобретения используется для обозначения "и/или", если явно не указано, что оно относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя описание поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или". Используемый в данном документе термин "другой" может означать по меньшей мере второй или более.

Во всей этой заявке термин "около" используется для указания того, что значение включает в себя внутреннее изменение ошибки для устройства, способ, используемый для определения значения, или изменение, которое существует среди субъектов исследования.

Другие объекты, признаки и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают предпочтительные варианты осуществления изобретения, даны только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники из этого подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

Следующие графические материалы составляют часть данного описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов данного изобретения. Изобретение может быть лучше понято при обращении к одному или более из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в данном документе.

Фиг. 1 - концентрация антисмыслового олиго Grb2 в плазме пациентов. Уровень BP1001 в плазме снизился в два раза по экспоненте. Сплошные линии были дозами 60 мг/м<sup>2</sup>; пунктирные линии были дозами 90 мг/м<sup>2</sup>.

Фиг. 2 - BP1001+низкая доза Ага-С снижает бласты костного мозга у пациентов с рефрактерной/рецидивирующей ОМЛ.

Фиг. 3 - схема дизайна исследования.

Фиг. 4 - диаграмма, иллюстрирующая критическую роль GRB2 в передаче сигналов тирозинкиназы.

Фиг. 5А-В - селективное ингибирование продукции белков Grb2. BV173 (Фиг. 5А) и ALL-1 (Фиг. 5В) клетки инкубировали с 4-8 мкМ антисмысловых олиго L-Grb2 и олиго L-контроля. После трех дней культивирования белоксодержащие слои готовили и подвергали SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Блоты разрезали на срезы и инкубировали с антителами, специфичными для белка Grb2 (мишень) или Crk1 (контроль).

Фиг. 6А-В - активность BP1001 на мышинной модели лейкемии. Фиг. 6А демонстрирует лечение

мышей, несущих 32Dp210 BCR-ABL-положительные ксенотрансплантаты лейкемии, с 15 мг/кг/доза BP1001. Фиг. 6B демонстрирует лечение мышей, несущих 32Dp210 BCR-ABL-положительные лейкозные клетки, с 5, 10 или 15 мг/кг/доза BP1001.

Фиг. 7A-C - влияние времени и последовательности введения BP1001 и дазатиниба. Фиг. 7A демонстрирует 1-часовую предварительную обработку BP1001 до введения дозы дазатиниба. Фиг. 7B демонстрирует 1-дневную предварительную обработку дазатинибом до введения дозы BP1001. Фиг. 7C демонстрирует 1-дневную предварительную обработку BP1001 до введения дозы дазатиниба.

Фиг. 8A-D - BP1001 усиливает индукцию гибели клеток дазатинибом. Фиг. 8A демонстрирует процент клеток в суб-G1 фазе. Фиг. 8B демонстрирует процент клеток в G1 фазе. Фиг. 8C демонстрирует процент клеток в S фазе. Фиг. 8D демонстрирует процент клеток в G2/M фазе.

Фиг. 9A-B - предварительное лечение BP1001 усиливает индукцию гибели клеток от дазатиниба и nilотиниба. Фиг. 9A демонстрирует процент клеток в суб-G1 фазе после предварительного лечения BP1001. Фиг. 9B демонстрирует процент клеток в суб-G1 фазе после предварительного лечения ингибитором тирозинкиназы.

#### **Описание иллюстративных вариантов осуществления изобретения**

Белок 2, связанный с рецептором фактора роста (Grb2).

Ген *grb2* был картирован в области хромосомы человека 17q22-qter, области, которая дуплицирована при лейкозах, что может привести к увеличению числа копий генного продукта *grb2*. Поскольку Grb2 важен для трансформации мышечных кроветворных клеток и пролиферации клеток лейкемии человека, которые экспрессируют высокие уровни онкогенных тирозинкиназ, ингибирование Grb2 может оказать существенное влияние на природную историю лейкозов.

Grb2 связывает онкогенные тирозинкиназы с их нижестоящими сигнальными молекулами, такими как ERK и AKT, которые являются критическими регуляторами клеточной пролиферации и выживания. Адаптерный белок Grb2 содержит один домен Src гомологии 2 (SH2), фланкированный двумя доменами Src гомологии 3 (SH3). Grb2 использует свой домен SH2 для связывания с остатками фосфотирозина, обнаруженными в активированных тирозинкиназах, таких как Bcr-Abl, c-Cbl и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), в то время как он использует свои домены SH3 для связывания с богатыми пролином мотивами, такими как те, которые обнаружены в факторе обмена гуаниновых нуклеотидов, Son of Sevenless (SOS). RAS, белок ГТФазы, активен, когда связан с ГТФ, и неактивен, когда связан с ГДФ. Факторы обмена гуаниновых нуклеотидов, такие как SOS, увеличивают обмен ГДФ на ГТФ на RAS. После стимуляции фактором роста комплекс Grb2-SOS рекрутируется на плазматическую мембрану, где он использует свой домен SH2 для связывания со стимулированными фактором роста рецепторами тирозинкиназы. Это связывание позволяет SOS находиться в непосредственной близости от RAS, который локализован на плазматической мембране. Таким образом, он способен стимулировать активность RAS. Активация RAS, в свою очередь, активирует множество нижестоящих сигнальных путей, важных для регуляции разнообразных клеточных процессов (Tari, 2001a).

Наиболее известным сигнальным путем RAS является каскад протеинкиназ, активируемый митогеном (MAP). В этом каскаде RAS связывается с RAF в ГТФ-зависимым способом. Это связывание приводит к активации RAF. Активированный RAF фосфорилирует MEK (митоген-активируемую киназу протеинкиназы), который, в свою очередь, фосфорилирует и активирует ERK1,2 (внеклеточные регулируемые киназы 1,2). Активированный ERK1,2 затем транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию путем фосфорилирования факторов транскрипции (например, ELK-1 и MYC). Фиг. 4 иллюстрирует путь передачи сигналов Grb2. Как и онкоген Bcr-Abl, протоонкоген c-Cbl конститутивно фосфорилируется тирозином в клетках ХМЛ. Grb2 может опосредовать управляемые c-CBL пути в клетках ХМЛ, поскольку было показано, что Grb2 образует стабильные комплексы с c-Cbl. Это взаимодействие может привести к злокачественной трансформации миелоидных клеток-предшественников.

За счет ингибирования Grb2, комплекс Grb2-SOS больше не способен обменивать ГДФ на ГТФ на RAS. Следовательно, происходит подавление каскада MAP-киназы и его последующей транскрипции (Tari 2001a).

Ингибирование экспрессии гена Grb2.

Были исследованы несколько стратегий для ингибирования функции Grb2. Одна стратегия включает клонирование альтернативно сплайсированной формы Grb2, которая имеет удаленный нефункциональный домен SH2 (Fath, 1994). Кодированный белок Grb3-3 не будет связываться с фосфорилированным EGFR, поскольку удаленные остатки являются неотъемлемой частью связывания Grb2 с остатками фосфотиозина; Grb3-3, однако, сохраняет функциональные домены SH3. Следовательно, Grb3-3 может конкурировать с Grb2 в связывании факторов обмена гуаниновых нуклеотидов. В исследовании Fath et al. (1994), микроинъекция Grb3-3 в фибробласты Swiss 3T3 индуцировала их апоптоз. Эти клоны сконструированы для конкуренции с Grb2 в связывании факторов обмена гуаниновых нуклеотидов.

Вторая стратегия использует низкомолекулярные ингибиторы для предотвращения связывания рецепторов фактора роста с доменом SH2 Grb2 (Gay, 1999). Эти низкомолекулярные ингибиторы Grb2 SH2 разработаны с использованием молекулярных моделей, основанных на рентгеновских структурах Grb2, в комплексе с фосфопептидными лигандами, содержащими мотив Tug-X-Asn-X. Эти ингибиторы содержат

элементы, способные распознавать и избирательно связывать домен SH2 Grb2. Целью этих ингибиторов является обратная онкогенная трансформация и предотвращение вызванной фактором роста подвижности клеток (Gay, 1999).

Третья стратегия включает использование Grb2-связывающих фосфопептидов (Williams, 1997). Обработка клеток проницаемыми для клеток связывающими Grb2 фосфопептидами приводит к их ассоциации с Grb2 и ингибированию связывания рецептора фактора роста с Grb2 (Williams, 1997). Это может остановить митогенез, стимулированный фактором роста.

В-четвертых, ингибирование экспрессии Grb2 может быть достигнуто с использованием антисмысловых олигонуклеотидов, комплементарных специфическим участкам мРНК Grb2. Когда антисмысловые олигонуклеотиды связываются с мРНК-мишенью, образуется гибрид ДНК-РНК. Образование гибрида ингибирует трансляцию мРНК и, следовательно, экспрессию кодируемого белка. Если белок Grb2 необходим для пролиферации клетки, его ингибирование может привести к подавлению роста. Ингибирование экспрессии Grb2 может также преодолевать лекарственную устойчивость и способствовать индуцированному химиотерапией апоптозу в раковых клетках.

Антисмысловая терапия Р-этокси олигонуклеотидом против Grb2 и его ингибирующая активность против ХМЛ и ОМЛ

Связанный с рецептором фактора роста белок-2 (Grb2) используется онкогенными тирозинкиназами, такими как Vcr-Abl, для активации пути Ras. Grb2 необходим Vcr-Abl для трансформации фибробластов и индуцирования лейкозоподобных заболеваний у мышей. BP1001, включенный в липосомы антисмысловой олигодезоксинуклеотид (олиго), специфичный к мРНК grb2, был разработан для блокирования экспрессии Grb2. Непрерывная последовательность кДНК Grb2 представлена в SEQ ID NO: 2, и последовательность белка Grb2 представлена в SEQ ID NO: 3.

Стратегия, используемая в этом исследовании для ингибирования Grb2, использует включенный в липосомы, устойчивый к нуклеазам антисмысловый олигонуклеотид, специфичный для мРНК Grb2. Антисмысловое олигонуклеотидное лекарственное вещество в BP1001 представляет собой устойчивый к нуклеазам аналог фосфодиэфира, который содержит Р-этокси остов. Эта структура была выбрана по одному с фосфоротиоатным остовом, потому что в ней отсутствует остаток серы. Остаток серы в фосфотиоатном остове был связан (влият) с геморагической диатез.

Используемая олигонуклеотидная последовательность представляет собой: 5'-АТАТТТГГСГАТГГСТТС-3' (SEQ ID NO: 1), и она специфична для сайта инициации трансляции мРНК Grb2 человека, тем самым нарушая продукцию белка Grb2. Было показано, что этот антисенс ингибирует экспрессию Grb2 и рост клеток в Vcr-Abl-положительных лейкозных клетках, а также в клетках рака молочной железы, которые экспрессируют высокие уровни HER2/neu или EGFR (фиг. 5А-В).

BP1001 представляет собой нейтральную липосому, объединенную с устойчивым к нуклеазе гидрофобным Р-этокси антисмысловым олиго, нацеленным на мРНК Grb2. В доклинических исследованиях BP1001 был эффективен в индукции ингибирования роста и снижения ERK1,2 и фосфорилирования Akt в чувствительных к иматинибу и устойчивых к иматинибу клеточных линиях ХМЛ. Кроме того, было показано, что BP1001 селективно ингибирует продукцию белка Grb2 в линиях Ph<sup>+</sup> лейкозных клеток BV173 и ALL-1, а также было обнаружено, что он ингибирует пролиферацию лейкозных линий клеток Vcr-Abl<sup>+</sup> (клеток ALL-1, BV173 и K562) (табл. 16).

Таблица 16. Ингибирование пролиферации лейкозных клеточных линий с помощью BP1001

Клеточная линия	[BP1001] мкМ	Время инкубации (дни)	Снижение жизнеспособности (%)	IC <sub>50</sub> (мкМ)
ALL-1	0-6	5	100	4
BV173	0-10	5	70	8
K562	0-12	4	80	8
HL60*	0-12	5	0	-

\* - Ph-отрицательная лейкозная клеточная линия (Vcr-Abl отрицательная).

Ингибирование экспрессии белка Grb2 привело к ингибированию роста клеток в клеточных линиях Vcr-Abl<sup>+</sup>, полученных от пациентов с Ph<sup>+</sup> лейкозом, демонстрируя, что Grb2 играет функциональную роль в индуцированной Vcr-Abl пролиферации клеток и, следовательно, играет жизненно важную роль в поддержании онкогенного потенциала Ph<sup>+</sup> лейкоза. Эти результаты показывают, что подавление белка Grb2 может приводить к ингибированию роста клеток, что регулируется тирозинкиназой Vcr-Abl.

BP1001 был эффективен в увеличении выживаемости мышей NOD/SCID, несущих Vcr-Abl-положительные ксенотрансплантаты лейкоза (Tari, 2007). Исследования показали противоопухолевый ответ на этот агент у мышей, которым инъецировали 32Dp210 Vcr-Abl-положительными клетками лейкоза, которых впоследствии лечили с BP1001.

В одном исследовании мышей, которым инъецировали 32Dp210 Vcr-Abl-положительные лейкозные клетки, лечили BP1001 (15 мг/кг/доза) или контролем (пустые липосомы DOPC) внутривенно, начиная с первого дня после инъекции опухолевых клеток, два раза в неделю в течение до 6 недель. Мышей ежедневно наблюдали на предмет состояния агонии/заболеваемости. Все выжившие мыши были умерщвлены.

ны на 40 день. У мышей, которым инъецировали 32Dp210 Bcr-Abl-положительные клетки лейкоза, 60%, которых лечили ВР1001, выживали на 40 день (конец исследования) по сравнению с 17% мышей, получавших пустые липосомы. Средняя продолжительность жизни у животных, которых лечили, составила  $31,6 \pm 13,1$  дня по сравнению с  $23,7 \pm 8,3$  дня в группе с пустой липосомой (фиг. 6А).

Во втором исследовании на мышах, которым инъецировали 32Dp210 Bcr-Abl-положительные лейкозные клетки, группы лечения получали ВР1001 в 5, 10 или 15 мг/кг/доза, вводимой внутривенно, начиная с одного дня после инъекции опухолевых клеток, два раза в неделю в течение до 7 недель. Контрольные группы получали липосомы DOPC, содержащие олигонуклеотид произвольной последовательности (15 мг/кг/доза) по той же схеме. Мышей ежедневно наблюдали на предмет состояния агонии/заболеваемости. Выжившие мыши в контрольных группах подвергались эвтаназии на 41 день, а в группах лечения на 48 день. При уровне дозы 15 мг/кг/доза 80% мышей, получавших ВР1001, выжили до 48 дня (конец исследования), по сравнению с 0% мышей, получавших 15 мг/кг/доза липосомального контрольного олигонуклеотида (фиг. 6В). Средняя продолжительность жизни составила  $44,2 \pm 8,5$  против  $20,4 \pm 7,9$  дня в этих группах соответственно. Средняя продолжительность жизни у мышей, получавших 5 или 10 мг/кг/доза ВР1001, составляла  $20,8 \pm 4,7$  и  $22,2 \pm 8,7$  дня соответственно. Результаты показали, что лечение ВР1001 дважды в неделю при уровне дозы 15 мг/кг/доза увеличивало выживаемость у мышей, индуцированных 32Dp210 Bcr-Abl-положительным ХМЛ, по сравнению с контрольной обработкой олигонуклеотидами.

Кроме того, значительное снижение периферических blastов наблюдалось у пациента с ХМЛ в фазе I исследования (от 81% до 5%) после получения четырех инфузий ВР1001. У больного был бластный криз ХМЛ, характеризующийся мутацией T315I. Эти данные предполагают, что Grb2 играет критическую роль в прогрессировании ХМЛ. Кроме того, доклинические исследования показывают, что предварительная обработка ВР1001 усиливает цитотрабиновую цитотоксичность в клетках острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

Фармакология и токсикология ВР1001.

Фармакокинетические исследования на крысах.

Фармакокинетические исследования ВР1001 были проведены на крысах после внутривенного (в/в) введения (Tari, 2007). Крысам Льюиса ( $n=5$ , 400 г) проводили канюляцию правой бедренной артерии и левой бедренной вены, и им вводили в/в радиоактивно меченный ( $^{32}\text{P}$ ) ВР1001 в дозе 10 мг олигонуклеотида на кг массы тела. Кровь (0,3 мл) собирали через правую бедренную артерию через 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 и 240 минут после инъекции. После каждого изъятия катетер промывали гепарином натрия 1:1000 (единиц/мл). Образцы цельной крови отбирали и анализировали на радиоактивность  $^{32}\text{P}$  с помощью жидкостной сцинтилляции, как описано ранее (Tari, 1998; Gutierrez-Puente, 1999).

Фармакокинетические параметры определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа (Rstrip; Micro Math, Inc., Солт-Лейк-Сити, Юта). Данные о концентрации лекарств в цельной крови лучше всего подходили для модели с двумя компонентами. Было обнаружено, что клиренс ВР1001 из крови точно соответствует двухкомпонентной математической модели (корреляция  $r^2 > 0,98$ ). Начальная фаза распределения произошла в течение первых 6 минут после инъекции ( $t_{1/2\alpha} = 5,16 \pm 0,3$  минуты). Период полувыведения терминальной фазы ( $t_{1/2\beta}$ ) составил  $225,6 \pm 13,2$  мин. Непосредственный видимый объем распределения ( $36,42 \pm 1,88$  мл) был выше, чем общий объем крови у крыс этого размера. Площадь под кривой концентрации (AUC) составляла  $5,4 \pm 0,9$  мг/мл  $\times$  мин, а время удержания составляло  $309,6 \pm 21,5$  минут.

Фармакокинетическое распределение ВР1001 и высокий объем распределения, наблюдаемые в этом исследовании, были сходны с данными, полученными для других исследованных ранее включенных в липосомы Р-этоксидолигонуклеотидов (Tari, 1998; Gutierrez-Puente, 1999).

Исследования распределения в ткани ВР1001 у мышей. Исследования распределения ВР1001 в ткани были проведены на мышах после в/в введения. Двадцать мышей (5/группа) были разделены на три группы испытуемых и одну контрольную группу. Группам испытуемых вводили в/в через хвостовую вену радиоактивно меченный ( $^{32}\text{P}$ ) ВР1001 в дозе 20 мг олигонуклеотида на кг массы тела. Инъецированных мышей умерщвляли ингаляцией  $\text{CO}_2$  через 4,24 и 48 часов после инъекции для извлечения органов. Контрольные животные были животными без инъекций. У всех животных отбирали ткани селезенки, печени, почек, сердца, желудка, легких и костного мозга, а образцы тканей (50-100 мг) из каждого органа взвешивали и обрабатывали. Радиоактивность  $^{32}\text{P}$  подсчитывали в сцинтилляционном счетчике. Результаты выражали в виде среднего мкг ВР1001/г ткани. Как и ожидалось, радиоактивности у контрольных животных обнаружено не было. Распределение ВР1001 в тканях было сходным с тем, которое сообщалось для других исследованных ранее включенных в липосомы Р-этоксидолигонуклеотидов. ВР1001 накапливается во всех исследованных тканях с наибольшим накоплением в тканях селезенки, печени и почек. Через 4 ч после инъекции средние концентрации ВР1001 в ткани на г ткани были: 64 мкг (селезенка), 50 мкг (печень), 34 мкг (почка) и варьировались от 12-34 мкг в других тканях. Период полувыведения из ткани составлял приблизительно 24 часа в селезенке, печени, почках, сердце и желудке и 48 часов в легких. Минимальное количество ВР1001 ( $\sim 0,4$  мкг в двух бедрах) было обнаружено в костном мозге,

где концентрация оставалась относительно постоянной в течение 72 часов.

Токсикология ВР1001.

Исследование токсичности однократной дозы на мышах.

В исследовании токсичности одной дозы ВР1001 15 самцов мышей ICR (5/группа) были отнесены к контрольной группе без инъекций (группа I) и двум группам лечения (группы II и III) для получения 15 и 30 мг олиго/кг внутривенно через хвостовую вену в виде одной инъекции. Пятнадцать самок мышей ICR (5/группа) были отнесены к контрольной группе без инъекций (группа IV) и двум группам лечения (группы V и VI) для получения 20 и 40 мг олиго/кг соответственно внутривенно через хвостовую вену в виде одной инъекции. Животных осматривали ежедневно и собирали кровь для гематологической оценки и клинической биохимии через две и шесть недель после инъекции. Животных умерщвляли после взятия крови через шесть недель после инъекции и собирали ткани для грубой и микроскопической оценки токсичности органов. Никаких признаков заболеваемости или смертности не наблюдалось. Однократные внутривенные инъекции 15-40 мг/кг ВР1001 не вызывали связанных с лекарственными средствами поражений в исследуемых органах. Снижение количества белых кровяных телец наблюдалось через две недели после инъекции 30 и 40 мг олиго/кг. Восстановление количества белых кровяных телец наблюдалось через шесть недель после инъекции 30 мг олиго/кг. Среднее значение количества белых кровяных телец не было полностью восстановлено через шесть недель у животных, получавших 40 мг олиго/кг, но статистически не отличалось от контроля (Tagi, 2007).

Исследование токсичности множественных доз на мышах.

В исследовании токсичности множественных доз ВР1001 на мышах, 24 мыши ICR (беспородная линия мышей из Института исследований рака; 5 самок/группа, 3 самца/группа) были отнесены к контрольной группе без инъекций (группа I) и двум группам лечения (группы II-III) для приема 15 и 25 мг олиго/кг внутривенно через хвостовую вену ежедневно в течение пяти последовательных дней. Животных осматривали ежедневно и собирали кровь для гематологической оценки и клинической биохимии через две и шесть недель после инъекции. Животных умерщвляли после взятия крови через шесть недель после инъекции и собирали ткани для грубой и микроскопической оценки токсичности органов. Никаких признаков заболеваемости или смертности не наблюдалось. Множественные внутривенные инъекции 15-25 мг/кг ВР1001 не вызывали связанных с лекарственными средствами поражений в исследуемых органах. Снижение количества белых кровяных телец наблюдалось через две недели после инъекции в группах лечения, которое сохранялось через шесть недель после инъекции. Дифференциальные подсчеты белых кровяных телец показали, что конкретные популяции белых кровяных телец у животных, которых лечили, не отличались от контроля (Tagi, 2007).

Исследования токсичности множественных доз на кроликах.

Было проведено исследование потенциальной токсичности внутривенного введения ВР1001 два раза в неделю (медленный болюс) у голландских кроликов. ВР1001 вводили в течение 28-дневного периода с последующей двухнедельной фазой восстановления. Дизайн исследования был таким, как показано в таблице.

Дизайн исследования токсичности на кроликах

Номер группы	Обозначение группы	Уровень дозировки (мг/кг)	Концентрация дозировки (мг/мл)	Объем дозировки (мл/кг)	Количество животных*	
					Самцы	Самки
1	Низкая доза	3,75	2,5	1,5	9	9
2	Средняя доза	5,00	2,5	2,0	9	9
3	Высокая доза	7,50	2,5	3,0	9	9

\* - из каждой группы 3 самца и 3 самки кроликов были подвергнуты эвтаназии в дни исследований 4, 29 и 42.

Дозы вводили в дни исследования 1, 3, 8, 10, 15, 17, 22 и 24. Первый день введения дозы в исследовании был обозначен как 1-й день исследования. Дозы вводились примерно в одно и то же время каждый день. Индивидуальные объемы дозы рассчитывали на основе последней зарегистрированной массы тела для каждого животного. Уровни дозы в 1-й день исследования рассчитывали на основе веса тела перед тестированием. Основываясь на дизайне этого исследования, не было явных токсикологических изменений в клинических наблюдениях, весе тела, цитологии костного мозга, клинической патологии, весе органов или микроскопических результатах. При вскрытии было сделано три макроскопических наблюдения. Макроскопическое наблюдение небольшого желчного пузыря проводилось в группе 1, самец 4-го дня исследования (№ 8939), и группе 2, самка 42-го дня исследования (№ 8968). Группа 1, самец 29-го дня исследования (№ 8944), имел макроскопическое наблюдение темных очагов, охватывающих все доли легкого. Эти не зависящие от дозы результаты, по-видимому, не были связаны с введением ВР1001. Основываясь на дизайне этого исследования, не было явной токсичности при внутривенном (медленном

болуе) введении дважды в неделю 3,75, 5,00 или 7,50 мг/кг VP1001 в клинических наблюдениях, весе тела, цитологии костного мозга, клинической патологии, весе органа или микроскопических находок. Кроме того, результаты показали, что, когда VP1001 вводили кроликам, не наблюдалось влияния на параметры коагуляции.

Исследование мутагенности по Эймсу VP1001 был протестирован в исследовании мутагенности по Эймсу. Хлорид натрия (0,9%) добавляли во флаконы VP1001, содержащие 5 мг олигонуклеотида Grb2. Образец был протестирован против пяти штаммов сальмонелл в различных концентрациях в присутствии и в отсутствие системы активации фермента S-9. Образец не был мутагенным для протестированных штаммов.

In vitro тест на аберрацию хромосом у млекопитающих (клетки CHO) VP1001 был протестирован в анализе хромосомной аберрации с использованием клеток CHO как в отсутствие, так и в присутствии Aroclor-индуцированной системы активации S9. Предварительный тест на токсичность был выполнен для определения диапазона доз для анализа хромосомной аберрации. Анализ аберрации хромосом был использован для оценки кластогенного потенциала VP1001. На основании результатов этого исследования был сделан вывод, что VP1001 является отрицательным для индукции структурных и численных хромосомных аберраций в клетках CHO как в неактивированных, так и в S9-активированных тест-системах.

Клинические исследования VP1001 на людях.

Исследование VP1001 фазы I состояло из двух частей: (A) повышение дозы VP1001 и (B) VP1001 с одновременным увеличением дозы низкодозового цитарабина (LDAC). Для повышения дозы (часть A) использовали стандартный дизайн "3+3", в котором последовательные группы из 3 или более пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями лечили возрастающими дозами от 5 до 135 мг/м<sup>2</sup> VP1001 до идентификации максимальной переносимой дозы (МПД). Для части исследования, посвященной повышению дозы (Часть B), две последовательные подгруппы пациентов с ОМЛ лечили VP1001 с МПД (или самой высокой протестированной дозой [НТД]) и на один уровень ниже МПД (или НТД) в сочетании с фиксированной дозой LDAC для дальнейшей характеристики безопасности и биологического эффекта, а также для определения рекомендуемой дозы фазы 2. В обеих частях исследования использовался открытый последовательный дизайн с повышением дозы для оценки безопасности, переносимости и токсичности, фармакокинетики (ФК), опухолевого ответа и антилейкозной активности. Всего в исследовании приняли участие 39 пациентов: ОМЛ (n=30), ХМЛ-БФ (n=5) и МДС (n=4). Из 39 пациентов 27 были оценены; 12 не завершили полный цикл из-за прогрессирования заболевания и были заменены в соответствии с протоколом. Только один пациент при дозе 5 мг/м<sup>2</sup> испытывал дозоограничивающую токсичность (ДОТ), воспаление слизистой оболочки 3 степени и синдром "кисть-стопа", во время принятия высокой дозы гидроксимочевины для лечения пролиферативного ХМЛ-БФ. Исследуемый препарат не может быть исключен как способствующий фактор, поэтому об этом событии было сообщено как о ДОТ. После расширения до шести пациентов, ни у одного пациента не развилось ДОТ. Другой лекарственной токсичности не наблюдалось ни у одного из пролеченных пациентов. МПД не была идентифицирована. НТД для VP1001 составляет 90 мг/м<sup>2</sup>.

Среди 27 оцениваемых пациентов была введена медиана одного цикла (1-5): четыре получили два цикла, три получили три цикла, четыре получили пять циклов, а все остальные получили один цикл. Из 21 поддающегося оценке пациента в группах с одним агентом (часть A) 10 испытали  $\geq 50\%$ -ное снижение количества периферических бластов или бластов костного мозга; у двух было улучшение поражения кожи при лейкозе; шесть имели неустойчивое снижение числа бластов. Среди шести оцениваемых пациентов, получавших комбинированную терапию VP1001+LDAC (часть B), трое достигли полной ремиссии (CR) и двое достигли частичной ремиссии (PR).

Исследования биомаркеров Grb2.

Проточную цитометрию использовали для определения уровней белков Grb2 и pErk в циркулирующих лейкозных клетках пациентов, которые получали терапию одним агентом VP1001, и сообщали о ней как о средней интенсивности флуоресценции (MFI). MFI Grb2 и pErk во время лечения сравнивали с таковыми на исходном уровне. В последнем измеренном образце (конец обработки или цикл 1 день 22) VP1001 снизил  $\geq 25\%$  уровней Grb2 в 10 из 12 образцов, и  $\geq 25\%$  уровней pErk в 7 из 12 образцов. Среднее снижение уровней Grb2 составило 49% (диапазон: от 28 до 91%), а уровень pErk составил 52% (диапазон: от 27 до 91%).

Фармакокинетические исследования.

Фармакокинетический (ФК) анализ проводили на образцах плазмы, взятых у рефрактерных/рецидивирующих пациентов с диагнозом ОМЛ, получавших VP1001 (60 мг/м<sup>2</sup>)+LDAC или получавших VP1001 (90 мг/м<sup>2</sup>)+LDAC. В обеих группах T<sub>max</sub> было через 1 ч после введения. C<sub>max</sub> обеих доз составлял 82 нг/мл. Однако период полураспада VP1001 в плазме был больше для дозы 60 мг/м<sup>2</sup>, чем для дозы 90 мг/м<sup>2</sup> (29,6±8,1 ч против 11,8±5,4 ч). Степень клиренса VP1001 была ниже для дозы 60 мг/м<sup>2</sup>, чем для дозы 90 мг/м<sup>2</sup> (133±24 л/ч против 205±70 л/ч). Эти результаты показывают, что доза 60 мг/м<sup>2</sup> VP1001 может быть более благоприятной, чем доза 90 мг/м<sup>2</sup>.

### Липиды и липосомы.

Термин "липосомы" используется в данном документе для обозначения липидосодержащих везикул, имеющих липидный бислой, а также других частиц липидного носителя, которые могут захватывать или включать антисмысловые олигонуклеотиды. Как таковая, липосома - это общий термин, охватывающий множество однослойных, многослойных и мультивезикулярных липидных носителей, образованных в результате образования закрытых липидных бислоев или агрегатов. Кроме того, липосомы могут иметь неопределенную ламеллярную структуру. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной двухслойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные растворы между липидными бислоями (Ghosh and Bachhawat, 1991). Однако данное изобретение также охватывает композиции, которые имеют другие структуры в растворе, чем нормальная везикулярная структура. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов молекул липидов.

Липосомы представляют собой форму наночастиц, которые являются носителями для доставки различных лекарств в пораженную ткань. Оптимальный размер липосом зависит от ткани-мишени. В опухолевой ткани сосудистая сеть прерывистая, и размеры пор варьируются от 100 до 780 нм (Siwak et al., 2002). Для сравнения, размер пор в нормальной эндотелии сосудов составляет <2 нм в большинстве тканей и 6 нм в посткапиллярных венах.

Считается, что отрицательно заряженные липосомы быстрее удаляются из кровообращения, чем нейтральные или положительно заряженные липосомы; однако недавние исследования показали, что тип отрицательно заряженного липида влияет на скорость поглощения липосом ретикулоэндотелиальной системой (РЭС). Например, липосомы, содержащие отрицательно заряженные липиды, которые не экранированы стерически (фосфатидилсерин, фосфатидная кислота и фосфатидилглицерин), выводятся быстрее, чем нейтральные липосомы. Интересно, что катионные липосомы (1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан [DOTAP]) и комплексы катион-липосома-ДНК более активно связываются и интернализируются эндотелиальными клетками ангиогенных кровеносных сосудов посредством эндоцитоза, чем анионные, нейтральные или стерически стабилизированные нейтральные липосомы (Thurston et al., 1998; Krasnici et al., 2003). Катионные липосомы могут не быть идеальными носителями доставки для опухолевых клеток, потому что поверхностные взаимодействия с опухолевыми клетками создают электростатически полученный барьерный эффект сайта связывания, ингибируя дальнейшую ассоциацию систем доставки с опухолевыми сфероидными (Kostarelos et al., 2004). Однако нейтральные липосомы, по-видимому, лучше проникают внутрь опухоли. Токсичность для специфических липосомальных препаратов также вызывает беспокойство. Катионные липосомы вызывают дозозависимую токсичность и воспаление легких, способствуя высвобождению промежуточных соединений активного кислорода, и этот эффект более выражен у многовалентных катионных липосом, чем у одновалентных катионных липосом, таких как DOTAP (Dokka et al., 2000). Нейтральные и отрицательные липосомы, по-видимому, не проявляют токсичности для легких (Guitierrez-Puente et al., 1999). Катионные липосомы, хотя и эффективно поглощают нуклеиновые кислоты, имели ограниченный успех для подавления гена *in vivo*, возможно, из-за их стабильной внутриклеточной природы и, как следствие, неспособности высвобождать содержимое нуклеиновых кислот. Липиды с нейтральным зарядом или липидные композиции с нейтрализованным зарядом, например, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), используются в данном документе из-за нейтральных свойств и успеха в доставке антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*.

Данное изобретение обеспечивает способы и композиции для связывания олигонуклеотида, такого как антисмысловый олигонуклеотид, с липидом и/или липосомой. Олигонуклеотид может быть включен в водную внутреннюю часть липосомы, вкраплен в липидный бислой липосомы, присоединен к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, в комплексе с липосомой, диспергирован в растворе, содержащем липид, смешивают с липидом, объединяют с липидом, содержат в виде суспензии в липиде, содержат или образуют комплекс с мицеллой или иным образом связывают с липидом. Композиции, связанные с липосомами или липосомами/олигонуклеотидами, представленные в данном документе, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл, или в "сжатой" структуре. Они также могут просто вкрапляться в раствор, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными ни по размеру, ни по форме.

### Липиды.

Липиды - это жирные вещества, которые могут быть природными или синтетическими. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые хорошо известны специалистам в данной области, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды. Примером является липид 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

Липидные композиции по данному изобретению могут содержать фосфолипиды. В некоторых ва-

риантах осуществления изобретения, один вид или тип фосфолипида может быть использован при создании липидных композиций, таких как липосомы. В других вариантах осуществления изобретения, может использоваться более одного вида или типа фосфолипида.

Фосфолипиды включают глицерофосфолипиды и некоторые сфинголипиды. Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, диолеилфосфатидилхолин ("DOPC"), яичный фосфатидилхолин ("EPC"), дилаурилоилфосфатидилхолин ("DLPC"), димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), дилинолеилфосфатидилхолин, 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-дидеиросеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("MPPC"), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин ("PMPC"), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин ("PSPC"), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("SPPC"), пальмитоилолеилфосфатидилхолин ("POPC"), 1-олеил-2-пальмитоилфосфатидилхолин ("OPPC"), дилаурилоилфосфатидилглицерол ("DLPG"), димиристоилфосфатидилглицерол ("DMPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерол ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерол ("DSPG"), диолеилфосфатидилглицерол ("DOPG"), димиристоилфосфатидная кислота ("DMPA"), дипальмитоилфосфатидная кислота ("DPPA"), дистеароилфосфатидная кислота ("DSPA"), диолеилфосфатидная кислота ("DOPA"), димиристоил фосфатидилэтанолламин ("DMPE"), дипальмитоил фосфатидилэтанолламин ("DPPE"), дистеароилфосфатидилэтанолламин ("DSPE"), диолеилфосфатидилэтанолламин ("DOPE"), пальмитоилолеил фосфатидилэтанолламин ("POPE"), димиристоил фосфатидилсерин ("DMPS"), дипальмитоил фосфатидилсерин ("DPPS"), фосфатидилсерин мозга ("BPS"), дистеароил сфингомиелин ("DSSP"), сфингомиелин мозга ("BSP"), дипальмитоил сфингомиелин ("DPSP"), лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилэтанолламин.

Фосфолипиды включают, например, фосфатидилхолины, фосфатидилглицерины и фосфатидилэтанолламины; поскольку фосфатидилэтанолламины и фосфатидилхолины не заряжены в физиологических условиях (то есть при pH около 7), эти соединения могут быть особенно полезны для получения нейтральных липосом. В определенных вариантах осуществления фосфолипид DOPC используется для получения незаряженных липосом или липидных композиций. В определенных вариантах осуществления изобретения, липид, который не является фосфолипидом (например, холестерином), также может быть использован

Фосфолипиды могут быть из природных или синтетических источников. Однако фосфолипиды из природных источников, такие как фосфатидилхолин яиц или сои, фосфатидиновая кислота мозга, фосфатидилинозитол мозга или растений, кардиолипин сердца, и растительный или бактериальный фосфатидилэтанолламин, не используются в некоторых вариантах осуществления изобретения в качестве основного фосфатида (то есть составляют 50% или более общей фосфатидной композиции), поскольку это может привести к нестабильности и утечке образующихся липосом.

Нейтральные липосомы.

Используемые в данном документе термины "нейтральные липосомы или липидная композиция" или "незаряженные липосомы или липидная композиция" определяются как липосомы или липидные композиции, имеющие один или более липидов, которые дают по существу нейтральный суммарный заряд (по существу, не заряжены). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейтральные липосомы или липидные композиции могут включать в основном липиды и/или фосфолипиды, которые сами являются нейтральными. В определенных вариантах осуществления изобретения, амфипатические липиды могут быть включены или использованы для создания нейтральных липосом или липидных композиций. Например, нейтральная липосома может быть создана путем объединения положительно и отрицательно заряженных липидов, так что эти заряды по существу взаимно компенсируют друг друга, в результате чего получается практически нейтральный суммарный заряд. Под "по существу нейтральным" или "по существу незаряженным" подразумевается, что немногие, если таковые имеются, липиды в данной популяции (например, популяции липосом) включают заряд, который не аннулируется противоположным зарядом другого компонента (например, менее чем 10% компонентов включают неаннулированный заряд, более предпочтительно менее чем 5% и наиболее предпочтительно менее чем 1%). В определенных вариантах осуществления данного изобретения может быть приготовлена композиция, в которой липидный компонент композиции является по существу нейтральным, но не находится в форме липосом.

Размер липосом варьируется в зависимости от способа синтеза. Липосома, суспендированная в водном растворе, обычно имеет форму сферической везикулы и может иметь один или более концентрических слоев молекул липидного бислоя. Каждый слой состоит из параллельного массива молекул, представленных формулой XY, где X представляет собой гидрофильный фрагмент, а Y представляет собой гидрофобный фрагмент. В водной суспензии концентрические слои расположены таким образом, что гидрофильные фрагменты имеют тенденцию оставаться в контакте с водной фазой, а гидрофобные участки имеют тенденцию к самоассоциации. Например, когда в липосоме присутствуют водные фазы, молекулы липидов могут образовывать бислои, известный как ламелла, компоновки XY-YX. Агрегаты липидов могут образовываться, когда гидрофильные и гидрофобные части более чем одной молекулы липида становятся связанными друг с другом. Размер и форма этих агрегатов будут зависеть от многих

различных переменных, таких как природа растворителя и присутствие других соединений в растворе.

Липосомы в пределах объема данного изобретения могут быть приготовлены в соответствии с известными лабораторными методиками, такими как, например, способ Bangham et al. (1965), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки; способ Gregoriadis (1979), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки; способ Deamer and Uster (1983), содержание которого включено посредством ссылки; и способ испарения с обращенной фазой, описанный Szoka и Papanadjoroulos (1978). Вышеупомянутые способы различаются по своим соответствующим способностям захватывать водный материал и их соответствующие отношения водного пространства к липиду.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейтральная липосома может использоваться для доставки олигонуклеотида, такого как антисмысловый олигонуклеотид. Нейтральная липосома может содержать один вид олигонуклеотида, направленного на подавление трансляции одного гена, или нейтральная липосома может содержать несколько видов олигонуклеотидов, которые направлены на подавление трансляции нескольких генов. Кроме того, нейтральная липосома может также содержать химиотерапевтическое средство в дополнение к олигонуклеотиду; таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения, химиотерапевтическое средство и олигонуклеотид могут быть доставлены в клетку (например, раковую клетку у человека) в одной и той же или отдельных композициях.

Высушенные липиды или лиофилизированные липосомы могут быть обезвожены и восстановлены в подходящей концентрации подходящим растворителем (например, буфером DPBS или Hepes). Затем смесь можно энергично встряхивать в вихревом смесителе. Липосомы могут быть ресуспендированы при подходящей концентрации общего фосфолипида (например, около 10-200 мМ). Неинкапсулированный олигонуклеотид может быть удален центрифугированием при 29000 g, а липосомные гранулы промыты. Альтернативно, неинкапсулированные олигонуклеотиды могут быть удалены путем диализа против избытка растворителя. Количество инкапсулированного олигонуклеотида может быть определено в соответствии со стандартными способами.

Ингибирование экспрессии генов.

Ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать транскрипцию или трансляцию гена в клетке. Олигонуклеотид может иметь длину от 5 до 50 или более нуклеотидов, а в некоторых вариантах осуществления изобретения от 7 до 30 нуклеотидов в длину. В определенных вариантах осуществления изобретения, олигонуклеотид может быть 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов длиной. Олигонуклеотид может содержать нуклеиновую кислоту и/или аналог нуклеиновой кислоты. Как правило, ингибирующий олигонуклеотид будет ингибировать трансляцию одного гена в клетке; однако в определенных вариантах осуществления изобретения, ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать трансляцию более чем одного гена внутри клетки.

Внутри олигонуклеотида компоненты олигонуклеотида не обязательно должны быть одного и того же типа или гомогенными по всему типу (например, олигонуклеотид может содержать нуклеотид и нуклеиновую кислоту или аналог нуклеотида). В определенных вариантах осуществления данного изобретения олигонуклеотид может содержать только одну нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты. Ингибирующий олигонуклеотид может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 или более смежных нуклеиновых оснований, включая все диапазоны между ними, которые гибридизуются с комплементарной нуклеиновой кислотой с образованием двухцепочечной структуры.

Нуклеиновые кислоты.

Данное изобретение предлагает способы и композиции для доставки олигонуклеотида через нейтральные липосомы. Поскольку олигонуклеотид состоит из нуклеиновой кислоты, способы, относящиеся к нуклеиновым кислотам (например, продуцирование нуклеиновой кислоты, модификация нуклеиновой кислоты и т.д.), также могут быть использованы в отношении олигонуклеотида.

Термин "нуклеиновая кислота" хорошо известен в данной области. Термин "нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, обычно относится к молекуле (т.е. цепи) ДНК, РНК или ее производного или аналога, содержащего нуклеиновое основание. Эти определения относятся к одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоте. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть образованы полностью комплементарным связыванием; однако в некоторых вариантах осуществления изобретения, двухцепочечная нуклеиновая кислота может быть образована путем частичного или по существу комплементарного связывания. Используемый в данном документе термин "одноцепочечная нуклеиновая кислота" может обозначаться префиксом "оц", а двухцепочечная нуклеиновая кислота - префиксом "дц".

Нуклеиновые основания.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновое основание" относится к гетероциклическому основанию, такому как, например, встречающееся в природе нуклеиновое основание (то есть А, Т, G, С или U), найденное по меньшей мере в одной встречающейся в природе нуклеиновой кислоте (то есть ДНК и РНК), а также встречающееся в природе или не встречающееся в природе производное(ые) и аналоги такого нуклеинового основания.

Нуклеиновое основание, как правило, может образовывать одну или более водородных связей (т.е. "отжигаться" или "гибридизоваться") по меньшей мере с одним встречающимся в природе нуклеиновым

основанием таким образом, который может заменить встречающееся в природе спаривание нуклеинового основания (например, водородную связь между А и Т, G и С, иАи U). Нуклеиновое основание может содержаться в нуклеозиде или нуклеотиде с использованием любого химического или естественного способа синтеза, описанного в данном документе, или известного специалисту в данной области.

"Пуриновое" и/или "пиримидиновое" нуклеиновое основание(я) охватывает встречающиеся в природе пуриновые и/или пиримидиновые нуклеиновые основания, а также их производное(ые) и аналог(и), включая, но не ограничиваясь этим, пурин или пиримидин, замещенный одним или более алкильным, карбоксиалкильным, амино, гидроксил, галогеновым (то есть фторо, хлоро, бромо или йодо), тиоловым или алкилтиоловым фрагментом. Предпочтительные алкильные (например, алкильные, карбоксиалкильные и др.) фрагменты содержат от около 1, около 2, около 3, около 4, около 5 до около 6 атомов углерода. Другие неограничивающие примеры пурина или пиримидина включают дезапурин, 2,6-диаминопурин, 5-фторурацил, ксантин, гипоксантин, 8-бромгуанин, 8-хлорогуанин, бромтилин, 8-аминогуанин, 8-гидроксигуанин, 8-метилгуанин, 8-тиогуанин, азагуанин, 2-аминопурин, 5-этилцитозин, 5-метилцитозин, 5-бромурацил, 5-этилурацил, 5-йодоурацил, 5-хлораурацил, 5-пропилурацил, тиюрацил, 2-метиладенин, метилтиоаденин, N, N-диметиладенин, азаденины, 8-бромаденин, 8-гидроксиаденин, 6-гидроксиаминопурин, 6-тиопурин, 4-(6-аминогексил/цитозин) и тому подобное. Производные или аналоги пурина и пиримидина включают, но не ограничиваются ими (аббревиатура/описание модифицированного основания): ас4с/4-ацетилцитидин, Мам5s2u/5-метоксиаминометил-2-тиоурин, Сhm5u/5-(карбоксигидроксилометил) уридин, Man q/Beta, D-маннозилквеозин, Cm/2'-O-метилцитидин, Мсm5s2u/5-метоксикарбонилметил-2-тиоурин, Сmnm5s2u/5-карбоксиметиламино-метил-2-тиоридин, Мсm5u/5-метоксикарбонилметилуридин, Сmnm5u/5-карбоксиметиламинометилуридин, Мо5u/5-метоксиуридин, D/дигидроуридин, Ms2i6a, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, Fm/2'-O-метилпсевдуридин, Ms2t6a/N-((9-бета-D-рибофуранозил-2-метилтиопуридин-6-ил)карбамоил)треонин, Gal q/бета, D-галактозилквеозин, Mt6a/N-((9-бета-D-рибофуранозилпуридин-6-ил)N-метил-карбамоил)треонин, Gm/2'-O-метилгуанозин, Mv/уридин-5-оксиуксусной кислоты метиловый эфир, I/инозин, о5u/уридин-5-оксиуксусная кислота (v), I6a/N6-изопентениладенозин, Osyw/ вибутоксозин, m1a/1-метиладенозин, P/псевдоуридин, m1f/1-метилпсевдоуридин, Q/квеозин, m1g/1-метилгуанозин, s2c/2-тиоцитидин, m1l/1-метилизозин, s2t/5-метил-2-тиоурин, m22g/2,2-диметилгуанозин, s2u/2-тиоурин, m2a/2-метиладенозин, s4u/4-тиоурин, m2g/2-метилгуанозин, T/5-метилуридин, m3c/3-метилцитидин, t6a/N-((9-бета-D-рибофуранозилпуридин-6-ил) карбамоил) треонин, t5c/5-метилцитидин, Tm/2'-O-метил-5-метилуридин, t6a/N6-метиладенозин, Um/2'-O-метилуридин, m7g/7-метилгуанозин, Yw/вибутозин, Мам5u/5-метиламинометилуридин или X/3-(3-амино-3-карбоксыпропил)уридин, (аср3)и.

#### Нуклеозиды.

Используемый в данном документе термин "нуклеозид" относится к отдельной химической единице, содержащей нуклеиновое основание, ковалентно связанное с линкерной группой нуклеинового основания. Неограничивающим примером "нуклеинового основания-линкер фрагмента" является сахар, содержащий 5 атомов углерода (то есть "5-углеродный сахар"), включая, но не ограничиваясь этим, дезоксирибозу, рибозу, арабинозу, или производное, или аналог 5-углеродного сахара. Неограничивающие примеры производного или аналога 5-углеродного сахара включают 2'-фтор-2'-дезоксирибозу или карбоциклический сахар, где углерод замещен атомом кислорода в сахарном кольце. Используемый в данном документе термин "фрагмент" обычно относится к меньшему химическому или молекулярному компоненту большей химической или молекулярной структуры.

В данной области известны различные типы ковалентного(ых) присоединения(ий) нуклеинового основания к нуклеиновому основанию линкерного фрагмента. В качестве неограничивающего примера, нуклеозид, содержащий пуридин (то есть А или G) или 7-дезапуридин-нуклеиновое основание, обычно содержит ковалентное присоединение положения 9 пурина или 7-дезапурина к положению 1' 5-углеродного сахара. В другом неограничивающем примере нуклеозид, содержащий пиримидиновое нуклеиновое основание (то есть С, Т или U), обычно содержит ковалентное присоединение положения 1 пиримидина к 1'-положению 5-углеродного сахара (Kornberg and Бейкер, 1992).

#### Нуклеотиды.

Используемый в данном документе термин "нуклеотид" относится к нуклеозиду, дополнительно содержащему "связь остова". Связь остова обычно ковалентно присоединяет нуклеотид к другой молекуле, содержащей нуклеотид, или к другому нуклеотиду с образованием нуклеиновой кислоты. "Связь остова" во встречающихся в природе нуклеотидах обычно содержит фосфатный фрагмент (например, фосфодиэфирную связь остова), которая ковалентно связана с 5-углеродным сахаром. Присоединение фрагмента остова обычно происходит в 3'- или 5'-положении 5-углеродного сахара. Однако в данной области известны другие типы присоединений, особенно когда нуклеотид содержит производные или аналоги встречающегося в природе 5-углеродного сахарного или фосфатного фрагмента.

#### Аналоги нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может содержать, или полностью состоять из, производного или аналога нуклеиновой основы, линкерного нуклеотидного фрагмента, и/или связи остова, которые могут присутствовать в природной нуклеиновой кислоте. Используемый в данном документе термин "производное" отно-

сится к химически модифицированной или измененной форме встречающейся в природе молекулы, в то время как термины "имитировать" или "аналог" относятся к молекуле, которая может или не может структурно напоминать встречающуюся в природе молекулу или фрагмент, но обладает похожими функциями. Нуклеинового основания, нуклеозидные и нуклеотидные аналоги или производные хорошо известны в данной области.

Неограничивающие примеры нуклеозидов, нуклеотидов или нуклеиновых кислот, содержащих производные или аналоги 5-углеродного сахара и/или связи остова, включены в патент США № 5681947, в котором описаны олигонуклеотиды, содержащие производные пурина, которые образуют тройные спирали с и/или предотвращают экспрессию дцДНК; патент США № 5652099 и 5763167, в которых описаны нуклеиновые кислоты, включающие флуоресцентные аналоги нуклеозидов, обнаруженных в ДНК или РНК, особенно для использования в качестве флуоресцентных зондов нуклеиновых кислот; патент США № 5614617, в котором описаны аналоги олигонуклеотидов с заменами на пиримидиновые кольца, которые обладают повышенной стабильностью нуклеазы; патент США № 5670663, 5872232 и 5859221, в которых описаны олигонуклеотидные аналоги с модифицированными 5-углеродными сахарами (т.е. модифицированные 2'-дезоксифуранозильные фрагменты), используемые при детекции нуклеиновых кислот; патент США № 544 6137, который описывает олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере один 5-углеродный сахарный фрагмент, замещенный в положении 4' заместителем, отличным от водорода, который можно использовать в анализах гибридизации; патент США № 5886165, в котором описаны олигонуклеотиды с дезоксирибонуклеотидами с 3' -5'-связями остова и рибонуклеотиды с 2'-5'-связями остова; патент США № 5714606, в котором описана модифицированная связь остова, в которой кислород в 3'-положении связи остова заменен углеродом для повышения устойчивости нуклеиновых кислот к нуклеазам; патент США № 5672 697, в котором описаны олигонуклеотиды, содержащие одну или более 5'-метиленфосфонатных связей остова, которые повышают устойчивость к нуклеазам; патент США № 5466786 и 5792847, в которых описана связь фрагмента заместителя, который может содержать лекарственное средство или метку, с 2'-углеродом олигонуклеотида для обеспечения повышенной стабильности нуклеазы и способности доставлять лекарственные средства или фрагменты для обнаружения; патент США № 5223618, в котором описаны олигонуклеотидные аналоги с 2 или 3 углеродной связью остова, присоединяющей положение 4' и положение 3' соседнего 5-углеродного фрагмента сахара для усиления клеточного поглощения, устойчивости к нуклеазам и гибридизации с целевой РНК; патент США № 5470967, в котором описаны олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну сульфаматную или сульфамидную связь остова, которые используются в качестве зондов гибридизации нуклеиновых кислот; патентах США № 5378825, 5777092, 5623070, 5610289 и 5602240, в которых описаны олигонуклеотиды с трех- или четырехатомным фрагментом связи остова, заменяющим фосфодиэфирную связь остова, используемую для улучшения устойчивости к нуклеазам, клеточного поглощения и регуляции экспрессии РНК; патент США № 5858988, в котором описан гидрофобный агент-носитель, присоединенный к положению 2'-О олигонуклеотидов для повышения проницаемости и стабильности их мембран; патент США 5214136, в котором описаны олигонуклеотиды, конъюгированные с антрахиноном на 5'-конце, которые обладают повышенной гибридизацией с ДНК или РНК; повышенная устойчивость к нуклеазам; патент США 5700922, в котором описаны химеры ПНК-ДНК-ПНК, где ДНК содержит 2'-деоксиэритропентофуранозил нуклеотиды для повышения устойчивости к нуклеазам, аффинности связывания и способности активировать РНКазу Н; патент США № 5708154, в котором описана РНК, связанная с ДНК с образованием гибрида ДНК-РНК; патент США № 5908845, в котором описаны полиэфирные нуклеиновые кислоты, в которых одна или более нуклеиновых оснований связаны с хиральными атомами углерода в полиэфирном остове; патент США № 5786461, 5891625, 5786461, 5773571, 5766855, 5736336, 5719262, 5714331, 5539082 и WO 92/20702, которые описывают пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК или аналог нуклеиновой кислоты на основе пептидов; или PENAM), которые обычно содержат один или более нуклеотидов или нуклеозидов, которые содержат нуклеотидный фрагмент, линкерный нуклеотидный фрагмент, которая не является 5-углеродным сахаром (например, аза-атомы азота, амидные и/или уреидные границы), и/или связь остова, которая не является фосфатной связью остова (например, аминоэтилглицин, полиамид, полиэтил, политиоамид, полисульфинамид или полисульфонамидная связь остова); и патент США № 5855911, который описывает гидрофобную, устойчивую к нуклеазам Р-этокси связь остова.

Другие модификации и применения аналогов нуклеиновых кислот известны в данной области, и ожидается, что эти способы и типы аналогов нуклеиновых кислот могут быть использованы с данным изобретением.

Подготовка нуклеиновых кислот.

Нуклеиновую кислоту можно получить любым способом, известным специалисту в данной области, таким как химический синтез, ферментативное или биологическое производство.

Неограничивающие примеры синтетической нуклеиновой кислоты (например, синтетического олигонуклеотида) включают нуклеиновую кислоту, полученную химическим синтезом *in vitro* с использованием химии фосфотриэфира, фосфита или фосфорамидита и твердофазных способов, таких как описанные в EP 266032, включенные в данный документ посредством ссылки, или дезоксинуклеозидными Н-

фосфонатными промежуточными соединениями, как описано Froehler et al. (1986) и пат. США № 5705629, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки. В способах по данному изобретению можно использовать один или более видов олигонуклеотидов. Различные механизмы синтеза олигонуклеотидов были описаны, например, в патенте США № 4659774, 4816571, 5141813, 5264566, 4959463, 5428148, 5554744, 5574146, 5602244, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Очистка нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может быть очищена на полиакриламидных гелях, центрифугированием в градиентах хлорида цезия или любым другим способом, известным специалисту в данной области (см., например, Sambrook et al. (2001), включенный в данный документ посредством ссылки).

В определенных вариантах осуществления данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. Используемый в данном документе термин "выделенная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, молекула РНК или ДНК), которая была изолирована свободной от, или иначе свободна от, основной части всей геномной и транскрибированной нуклеиновых кислот одной или более клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения "выделенная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, которая была выделена свободной от, или иным образом свободна от массы клеточных компонентов или компонентов реакции *in vitro*, таких как, например, макромолекулы, такие как липиды или белки, небольшие биологические молекулы и тому подобное.

Гибридизация.

Используемый в данном документе термин "гибридизация", "гибридизироваться(гибридизируются)" или "способный к гибридизации" означает образование двух- или трехцепочечной молекулы или молекулы с частичной двух- или трехцепочечной природой. Используемый в данном документе термин "отжиг" является синонимом слова "гибридизировать".

Используемые в данном документе "жесткое условие(я)" или "высокая строгость" представляют собой те условия, которые допускают гибридизацию между или в пределах одной или более цепи(ей) нуклеиновой кислоты, содержащих комплементарную последовательность(и), но исключают гибридизацию случайных последовательностей. Жесткие условия малотолерантны, если допускают небольшое несоответствие между нуклеиновой кислотой и целевой цепью, если таковые имеются. Такие условия хорошо известны специалистам в данной области техники и являются предпочтительными для применений, требующих высокой селективности.

Жесткие условия могут включать условия с низкой солью и/или высокой температурой, такие как обеспечение от около 0,02 М до около 0,15 М NaCl при температурах от около 50°C до около 70°C. Понятно, что температура и ионная сила желаемой строгости частично определяются длиной конкретной нуклеиновой кислоты(кислот), длиной и содержанием нуклеиновых оснований последовательности(ей)-мишени, составом заряда нуклеиновой кислоты(кислот) и присутствию или концентрации формамида, тетраметиламмонийхлорида или другого растворителя(ей) в гибридизационной смеси.

Также понятно, что эти диапазоны, композиции и условия для гибридизации упоминаются только в качестве неограничивающих примеров, и что желаемая строгость для конкретной реакции гибридизации часто определяется эмпирически путем сравнения с одним или более положительными или отрицательными контролями. В зависимости от предполагаемого применения предпочтительно использовать различные условия гибридизации для достижения различных степеней селективности нуклеиновой кислоты по отношению к последовательности-мишени. В неограничивающем примере идентификация или выделение связанной нуклеиновой кислоты-мишени, которая не гибридизуется с нуклеиновой кислотой в жестких условиях, может быть достигнуто путем гибридизации при низкой температуре и/или высокой ионной силе. Такие условия называются "условия низкой жесткости" или "условия низкой жесткости", и неограничивающие примеры низкой строгости включают гибридизацию, проводимую при температуре от около 0,15 М до около 0,9 М NaCl в диапазоне температур от около 20°C до около 50°C. Конечно, специалист в данной области техники может дополнительно модифицировать условия низкой или высокой строгости для соответствия конкретному применению.

Способ получения липосомального Р-этокси антисмыслового лекарственного препарата.

Антисмысловые олигонуклеотиды (олиго), комплементарные определенным участкам мРНК-мишени, использовали для ингибирования экспрессии эндогенных генов. Когда антисмысловые олигонуклеотиды связываются с мРНК-мишенью, образуется гибрид ДНК-РНК. Образование этого гибрида ингибирует трансляцию мРНК и, следовательно, экспрессию кодируемого белка. Если белок необходим для выживания клетки, ингибирование его экспрессии может привести к гибели клетки. Следовательно, антисмысловые олигонуклеотиды могут быть полезными инструментами в противораковой и противовирусной терапии.

Основными препятствиями в использовании антисмысловых олигонуклеотидов для подавления экспрессии генов являются нестабильность клеток, низкое клеточное поглощение и плохая межклеточная доставка. Природные фосфодиэфиры не устойчивы к нуклеазному гидролизу; таким образом, необ-

ходимы высокие концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, прежде чем наблюдается какой-либо ингибирующий эффект. Модифицированные аналоги фосфодиэфира, такие как Р-этокси, были созданы для преодоления этой проблемы нуклеазного гидролиза, но они не дали удовлетворительного решения проблемы.

Клеточное поглощение антисмысловых олигонуклеотидов низкое. Чтобы решить эту проблему, физические способы, такие как осаждение кальций-фосфата, опосредование DEAE-декстрана или электропорация, были использованы для увеличения клеточного поглощения олигонуклеотидов. Эти способы трудно воспроизвести и они неприменимы *in vivo*. Катионные липиды, такие как липофектин, также используются для доставки олигонуклеотидов. Между катионными липидами и отрицательно заряженными олигонуклеотидами образуется электростатическое взаимодействие, что приводит к образованию комплекса, который затем поглощается клетками-мишенями. Поскольку эти катионные липиды не защищают олигонуклеотиды от расщепления нуклеазой и вредны для клеточной мембраны, они полезны только для доставки устойчивых к нуклеазе фосфоротиоатов, но не для расщепляемых нуклеазой фосфодиэфиров.

Другой модифицированный аналог фосфодиэфира, который был получен, представляет собой Р-этокси. Р-этокси-антисмысловый остов не оказывает нежелательной реакции на кровотечение и активацию комплемента, что является некоторыми из токсических эффектов, которые были зарегистрированы для других антисмысловых аналогов. Модификации Р-этоксиолигонуклеотидов производятся в фосфатном остове, так что модификация не будет препятствовать связыванию этих олигонуклеотидов с мРНК-мишенью. Р-этоксиолигонуклеотиды получают путем добавления этильной группы к немостиковому атому кислорода фосфатного остова, что делает эти олигонуклеотиды незаряженными соединениями. Несмотря на их устойчивость к нуклеазам, клеточное поглощение и внутриклеточная доставка Р-этоксиолигонуклеотидов является плохим, поскольку при интернализации эти олигонуклеотиды остаются секвестрированными внутри эндосомных/лизосомных вакуолей, препятствуя их доступу к мРНК-мишени.

Р-этокси-антисмысловый лекарственный препарат.

Липосомальный антисмысловый Р-этокси лекарственный препарат состоит из двух продуктов цГМФ, оба из которых имеют FDA-требуемый сертификат анализа с одобренными FDA критериями высвобождения. Сырье, растворители и конечный лекарственный продукт описаны в данном документе. При изготовлении лекарственный продукт представляет собой лиофилизированный кристалл или порошок янтарного или белого цвета, который содержит следующие материалы: олигонуклеотид (например, Р-этокси-антисмысловое лекарственное вещество), нейтральные липиды (например, DOPC) и поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). При подготовке к введению пациенту в ампулу добавляется физиологический раствор, и в это время образуются липосомы с антисмысл-Р-этокси, встроенным во внутреннюю часть. Р-этокси-антисмысловое лекарственное вещество Конкретные физические свойства (например, растворимость и гидрофобность, которые затем влияют на растворимость лекарственного продукта в физиологическом растворе, включение олиго в липосомы и размер липосомных частиц) готового продукта могут быть определены с использованием предварительно определенного сырья с Р-этокси и фосфодиэфирным амидитом смешивать во время производства Р-этокси антисмысловой лекарственной субстанции. Хотя потеря Р-этокси группы остова происходит случайным образом во время производства олигонуклеотидов, что приводит к фосфодиэфирным связям в этих связях, эта потеря не может генерировать предпочтительное соотношение связи Р-этокси: фосфодиэфирная связь остова внутри олигонуклеотида. В этом случае смесь сырья с Р-этокси и фосфодиэфирным амидитом дополняет ожидаемую величину делеций Р-этокси остова, таким образом генерируя олигонуклеотид с желаемым соотношением. Увеличение количества молекул Р-этокси в остове олигонуклеотида приводит к тому, что молекула становится более гидрофобной (что приводит к более крупным липосомным частицам; табл. 1), менее полярной и менее растворимой (табл. 2).

Способы тестирования нейтрального по заряду гидрофобного Р-этокси лекарственного вещества включают масс-спектрометрию для определения распределения длин олигонуклеотидов и анализы для определения растворимости лекарственного вещества, которое для практических целей в отношении растворимости представляет собой визуальный осмотр лекарственного продукта, восстановленного в физиологическом растворе. Поскольку олигонуклеотид становится менее растворимым из-за большего числа Р-этокси-связей остова, восстановленный раствор становится более белым, пока образуются частицы, так как гидрофобность становится слишком высокой.

Таблица 1. Изменчивость размера частиц  
липосомы с составом антисмыслового остова

Эксперимент	Сконструированный антисмысловый остов	Удаление этила остова после производства		Характеристики размера частиц: Кумулятивная функция распределения		
		Главный Пик	Композитное удаление	90% значение (нм) **	50% значение (нм)	300 нм значение (%)
1	замещение 3 амидита	-6	-5,67	2130	911	15,30
2	замещение 3 амидита	-6	-5,67	2420	1004	15,50
3	замещение 3 амидита	-6	-6,12	3682	943	15,50
4	замещение 3 амидита	-7	-6,66	3805	978	14,60
5	100% Р-этокси	-5	-5,66	3924	976	16,00
6	замещение 2 амидита	-5	-5,32	4387	1888	11,60
7 <sup>a</sup>	100% Р-этокси	-4	-4,22	5057	1131	17,70
8	100% Р-этокси	-4	-4,52	5659	1359	10,00
9 <sup>b</sup>	100% Р-этокси	-4	-4,38	7571	1909	2,60
10 <sup>c</sup>	100% Р-этокси	-4	-4,38	7994	1653	14,40

\*\* - критерии высвобождения лекарственного средства для 90% липосомных частиц должны быть менее чем или равны 5000 нм,  
 а - эта партия была отклонена из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловых частиц в восстановленном растворе,  
 б - эта партия имела более низкий объем ДМСО и tBA с 2 мг антисмысла во флаконе объемом 20 мл, что добавило дополнительный компонент к увеличению липосом,  
 с - эта партия не была выпущена, потому что она не соответствовала спецификации по размеру частиц.

Таблица 2. Растворимость липосомных частиц с составом антисмыслового остова

Эксперимент	Сконструированный антисмысловый остов	Удаление этила остова после производства		Растворимость лекарственных средств	
		Главный Пик	Композитное удаление	Визуальное наблюдение **	Оценка растворимости
1	замещение 3 амидита	-6	-5, 67	раствор обезжиренного молока	хорошо
2	замещение 3 амидита	-6	-5, 67	раствор обезжиренного молока	хорошо
3	замещение 3 амидита	-6	-6, 12	раствор обезжиренного молока	хорошо
4	замещение 3 амидита	-7	-6, 66	раствор обезжиренного молока	хорошо
5	100% Р-этокси	-5	-5, 66	раствор обезжиренного молока	хорошо
6	замещение 2 амидита	-5	-5, 32	раствор обезжиренного молока	хорошо
7	100% Р-этокси	-4	-4, 52	белый раствор	проходит
8 <sup>b</sup>	100% Р-этокси	-4	-4, 38	белый раствор	проходит
9 <sup>c</sup>	100% Р-этокси	-4	-4, 38	белый раствор	проходит
10 <sup>a</sup>	100% Р-этокси	-4	-4, 22	частицы белого раствора	неудача

\*\* - если в образце лекарственного препарата есть частицы, партия будет отклонена,

a - эта партия была отклонена из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловых частиц в восстановленном растворе,

b - эта партия имела более низкий объем ДМСО и tBA с 2 мг антисмысла во флаконе объемом 20 мл, что добавило дополнительный компонент к увеличению липосом,

c - эта партия не была выпущена, потому что она не соответствовала спецификации по размеру частиц.

Составление, фильтрация и лиофилизация липосомального Р-этокси-антисмыслового лекарственного продукта

Один грамм (1 г) олиго pE растворяют в ДМСО в соотношении 10 мг олигонуклеотида на 1 мл ДМСО. Затем DOPC добавляют к трет-бутиловому спирту в соотношении 1 г DOPC на 1719 мл трет-бутилового спирта. Олиго и DOPC объединяют и смешивают в соотношении 1 г олигонуклеотида на 2,67 г DOPC. Затем к смеси добавляют 20 мл 0,835% (об./об.) раствора полисорбата 20, в результате чего конечная концентрация составляет 0,039 мг/мл. Раствор пропускают через стерильный фильтр до разлива в стеклянные флаконы для лиофилизации.

Влияние поверхностно-активного вещества на размер липосомных частиц определяли титрованием количества поверхностно-активного вещества (табл. 3). В отсутствие полисорбата 20 только 2,8% частиц имели диаметр 300 нм или менее. В присутствии 1x полисорбата 20 12,5% частиц имели диаметр 300 нм

или менее. С добавлением 3х-10х полисорбата 20 около 20% частиц имели диаметр 300 нм или менее. Таким образом, увеличение количества поверхностно-активного вещества от 1х до 3х приводит к уменьшению размера частиц.

Таблица 3. Изменчивость размера частиц липосомы с ПАВ

Эксперимент	Количество ПАВ	Характеристики размера частиц: Кумулятивная функция распределения		
		Значение 50%	Значение 90% **	Значение 300 нм
1	0х	5301 нм	10719 нм	2,8%
2	1х	1053 нм	4054 нм	12,5%
3	3х	785 нм	2926 нм	19,1%
4	5х	721 нм	2691 нм	21,9%
5	10х	734 нм	2937 нм	21,4%

Примечание [NLI]:

\*\* - критерии высвобождения лекарственного средства для 90% липосомных частиц должны быть менее чем или равны 5000 нм.

Приготовление липосомального Р-этоксид-антисмыслового лекарственного препарата для введения.

Лиофилизированный препарат гидратировали нормальным солевым раствором (0,9%/10 мМ NaCl) в конечной концентрации олиго 10-5000 мкМ. Липосомальные-Р-этоксид олиго смешивали путем встряхивания руками.

Способы тестирования липосомального Р-этоксид антисмыслового лекарственного препарата.

Визуальный осмотр изготовленного лекарственного препарата: после изготовления отбирают пробирку с лекарственным препаратом и проводят визуальный осмотр. Отсутствие жидкости является обязательным, и затем приемлемы янтарные кристаллы на дне флакона, и наилучшим результатом становится увеличение принятия до белого, хлопьевидного порошка или внешнего вида. Белый цвет указывает на лучший процесс сушки с высоким отношением площади поверхности к массе, что очень способствует восстановлению для использования.

Визуальный осмотр восстановленного препарата, готового для в/в пациенту: обычный физиологический раствор добавляют в пробирку, содержащую изготовленный липосомальный Р-этоксид-антисмысловый лекарственный продукт, и встряхивают для растворения в растворе с полностью растворенным кристаллом лекарственного препарата или порошком. Три основных наблюдения сделаны: 1) что кристалл или порошок полностью растворены, 2) нет белых сгустков нерастворенного материала, и 3) внешний вид имеет вид молочно-белого или обезжиренного молока. Чем голубее вид восстановленной жидкости, тем лучше, так как это сигнализирует о меньшем размере липосомных частиц, который отражает свет в синем спектре.

Масс-спектрометрия: масс-спектрометрия (масс-спектрометрия) используется для отображения профиля различных масс в образце. Когда производится антисмысловый Р-этоксид-материал, для образца проводится масс-спектрометрия. Результат показывает пики материала, присутствующего на сетке, масса которой увеличивается на оси "х" справа, а относительное содержание массы на оси "у" увеличивается вверх. Профиль из образца анализируют для определения относительного количества Р-этоксид-остовов в Р-этоксид-образце, признавая, что профиль пиков представляет собой (начиная с крайнего справа) материал полной длины со всеми остовами, состоящими из Р-этоксид-связи, следующий пик движется в полную длину с одного остова с Р-этоксид-делацией (и, следовательно, удаляется этил, и в результате получается нормальная фосфодиэфирная связь остова), и продолжается. Образец масс-спектров, смещенный вправо, представляет образец Р-этоксид, имеющий большее количество Р-этоксид-остовов и, следовательно, имеющий свойства быть более гидрофобным и менее растворимым; и аналогично, сдвинутый влево, имеющий противоположные эффекты. Проверка диаграммы масс-спектров характеристик образца также может быть использована для определения того, оказывает ли фильтрация во время производства какой-либо нежелательной реакции на композицию олигонуклеотидов, присутствующую в отфильтрованном лекарственном продукте.

УФ-тестирование: ультрафиолетовое световое тестирование используется для определения массы олигонуклеотида, присутствующего в образце. Олигонуклеотиды поглощают свет в диапазоне 260 нанометров. В результате, УФ-тестирование готового восстановленного лекарственного продукта стало использоваться в качестве способа определения количества олигонуклеотидного лекарственного вещества в пробирке лекарственного продукта. С точки зрения развития производства и инноваций, УФ-тестирование использовалось, чтобы определить, были ли проблемы, возникшие во время фильтрации на производстве, или плохая растворимость Р-этоксид антисмыслового лекарственного вещества, что приводило к меньшему количеству олигонуклеотидов в растворе и, следовательно, к более низким показаниям УФ-излучения. Способ будет проверен и, вероятно, станет частью тестирования финальной версии продукта.

Размер частиц липосомы: пробирку с готовым лекарственным препаратом восстанавливают и тестируют на размер частиц липосом. Результатом часто является приблизительно нормальное распределение, имеющее центральную точку, хвосты и средние значения, или приблизительно нормальное распределение.

деление большинства частиц и меньшие вторичные пики более мелких частиц липосом, возникающие в результате эффектов образования частиц второго порядка. Важно, чтобы липосомные частицы не были слишком большими, поскольку они могут создавать нежелательной реакции у пациентов (например, создавать проблемы с кровотоком в небольших кровеносных сосудах в легких). В результате критерии высвобождения лекарственного средства включают то, что тестирование размера частиц показывает, что 90% липосом имеют размер 5 микрон или менее. Кроме того, более мелкие липосомы являются предпочтительными, поскольку они будут лучше поглощаться клетками, и, во-вторых, более мелкие липосомы могут проникать в поры сосудов, тем самым позволяя липосомам проникать внутрь опухолей, повышая эффективность лечения липосомального Р-этоксидина антисмыслового лекарственного средства.

Способы лечения.

Определенные аспекты данного изобретения предоставляют способы лечения ракового пациента олигонуклеотид-липидным комплексом (например, олигонуклеотидом, включенным в нейтральную липосому), который содержит устойчивый к нуклеазе ингибирующий олиго, который нацелен на Grb2. В частности, олигонуклеотид может иметь последовательность, которая позволяет спаривать основание с нуклеотидной последовательностью человека в сайте инициации трансляции Grb2 и, таким образом, может ингибировать экспрессию Grb2. В некоторых аспектах способы дополнительно включают введение пациенту терапии первой линии, такой как, например, ингибитор тирозинкиназы (например, иманитиб, дазанитиб, нилотиниб, бозутиниб, понатиниб или бафетиниб) или аналог цитидина (например, децитабин, азациитидин или цитарабин).

"Лечение" и "лечить" относятся к введению или применению терапевтического агента субъекту или выполнению процедуры или способа лечения субъекта с целью получения терапевтической пользы для заболевания или состояния, связанного со здоровьем. Например, лечение может включать введение фармацевтически эффективного количества комплекса олигонуклеотид-липид.

"Субъект" и "пациент" относятся к человеку или не человеку, такому как приматы, млекопитающие и позвоночные. В конкретных вариантах осуществления изобретения, субъектом является человек.

Термин "терапевтическая польза" или "терапевтически эффективный", используемый в данной заявке, относится ко всему, что способствует или улучшает самочувствие субъекта в отношении медицинского лечения этого состояния. Это включает, но не ограничивается этим, уменьшение частоты или тяжести признаков, или симптомов заболевания. Например, лечение рака может включать, например, уменьшение размера опухоли, уменьшение инвазивности опухоли, снижение скорости роста рака или предотвращение метастазирования. Лечение рака может также относиться к продлению выживаемости субъекта с раком.

Опухоли, для которых полезны данные способы лечения, включают любые типы злокачественных клеток, такие как опухоли, обнаруженные в солидной опухоли, гематологической опухоли, метастатическом раке или неметастатическом раке. Типичные солидные опухоли могут включать, но не ограничиваются ими, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, печени, кожи, желудка, яичка, языка, матки, желудка, мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, кости, легкого, мочевого пузыря, меланомы, простаты и груди. Типичные гематологические опухоли включают опухоли костного мозга, злокачественные опухоли Т- или В-клеток, лейкемии, лимфомы, бластомы, миеломы и тому подобное. Дополнительные примеры раковых заболеваний, которые можно лечить с использованием способов, представленных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, рак, лимфому, бластому, саркому, лейкоз, плоскоклеточный рак, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка или живота (включая рак желудочно-кишечного тракта и желудочно-кишечный стромальный рак), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки или ренальный рак, рак предстательной железы, рак влагалища, рак щитовидной железы, различные типы рака головы и шеи, меланому, меланому поверхностного распространения, злокачественную меланому лентиго, анаральную лентигинозную меланому, узловые меланомы, а также В-клеточную лимфому (включая низкой степени/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); малую лимфоцитарную (SL) НХЛ; промежуточной степени/фолликулярную НХЛ; диффузную НХЛ промежуточной степени; иммунобластную НХЛ высокой степени; лимфобластную НХЛ высокой степени; НХЛ с малыми не расщепленными клетками высокой степени; генерализованную лимфаденопатию НХЛ; лимфому из мантийных клеток; связанную со СПИ-Дом лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема), хронический лимфобластный лимфолейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и хронический миелоидный лейкоз.

Рак может определенно иметь следующий гистологический тип, хотя он не ограничивается этим: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантский и веретеноцитный рак; мелкоклеточный рак; папиллярный рак; плоскоклеточный рак; лимфоэпителиальный рак; базально-клеточный рак; карцинома пиломатрикс; переходо-клеточный рак; папиллярный пере-

ходно-клеточный рак; аденокарцинома; гастринома, злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинированная гепатоцеллюлярная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденоидная кистозная карцинома; аденокарцинома при аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный полипоз кишечника; солидный рак; карциноидная опухоль злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; карцинома хромофобов; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярно-клеточный рак; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулированная склерозирующая карцинома; рак коры надпочечников; карцинома эндометриода; рак придатка кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церумная аденокарцинома; слизееобразующий плоскоклеточный рак; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидноклеточный рак; инфильтрирующая протоковая карцинома; медуллярный рак; дольковый рак; воспалительный рак; болезнь Педжета, молочные железы; ацинарно-клеточный рак; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома злокачественная; опухоль стромы яичника злокачественная; текома, злокачественная; гранулезная клеточная опухоль злокачественная; андробластома злокачественная; клеточный рак сертоли; опухоль клеток Лейдига, злокачественная; опухоль липидных клеток, злокачественная; параганглиома злокачественная; внегрудная параганглиома злокачественная; феохромоцитомы; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантских пигментированных невусах; меланома эпителиоидных клеток; синий невус злокачественный; саркома; фибросаркомы; фиброзная гистиоцитомы, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; леймиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; мультилирийная смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимомы злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; опухоль филоды, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома злокачественная; узел яичников, злокачественные; хориокарцинома; мезонефрома злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитомы злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; опухоль одонтогенная, злокачественная; амелобластная одонтогенная саркома; амелобластома злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома злокачественная; эпендимомы; астроцитомы; протоплазматическая астроцитомы; фибриллярная астроцитомы; астробластома; глиобластома; олигодендроглиомы; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; обонятельная нейрогенная опухоль; менингиома злокачественная; нейрофибросаркома; нейрилеммома злокачественная; зернисто-клеточная опухоль злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; парагранулема Ходжкина; злокачественные лимфомы, мелкие лимфоциты; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидная гранулема; другие уточненные неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативные заболевания тонкой кишки; лейкемия; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лимфосаркомная клеточная лейкемия; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; тучноклеточный лейкоз; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз.

В конкретном варианте осуществления изобретение предусматривает способы использования олигонуклеотид-липидного комплекса, включающие приведение в контакт популяции больных клеток *in vivo* с терапевтически эффективным количеством олигонуклеотид-липидного комплекса в течение периода времени, достаточного для ингибирования или реверсирования заболевания. В одном варианте осуществления изобретения, приведение в контакт *in vivo* осуществляют путем введения пациенту внутривенной, внутрибрюшинной, подкожной или внутриопухолевой инъекции терапевтически эффективного количества физиологически переносимой композиции, содержащей олигонуклеотид-липидный комплекс по данному изобретению. Комплекс олигонуклеотид-липид может вводиться парентерально путем инъекции или постепенной инфузии с течением времени.

Терапевтические композиции, содержащие олигонуклеотид-липидный комплекс, обычно вводят внутривенно или подкожно, например, путем инъекции стандартной дозы. Термин "единичная доза" при использовании в отношении терапевтической композиции относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичной дозы для субъекта, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым разбавителем, т.е. носителем или разбавителем.

Композиции вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, которое следует вводить, зависит от подлежащего лечению субъекта, способности системы субъекта использовать активный ингредиент и желаемой степени терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от суждения

практикующего врача и являются индивидуальными для каждого человека. Однако подходящие диапазоны доз для системного применения описаны в данном документе и зависят от пути введения. Подходящие режимы для начального и бустерного введения также рассматриваются и типичны для первоначального введения с последующими повторными дозами с интервалом в один или более часов с последующей инъекцией или другим введением. Примеры многократных введений описаны в данном документе и являются особенно предпочтительными для поддержания постоянно высокого уровня полипептида в сыворотке и ткани. Альтернативно, предполагается непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в диапазонах, указанных для терапии *in vivo*.

Предполагается, что способ по изобретению может предусматривать введение композиции олигонуклеотидов системно или локально для лечения заболевания, такого как ингибирование роста опухолевых клеток или уничтожение раковых клеток у раковых пациентов с местно-распространенным или метастатическим раком. Их можно вводить внутривенно, интратекально, подкожно и/или внутрибрюшинно. Их можно вводить отдельно или в комбинации с антипролиферативными препаратами. В одном варианте осуществления изобретения их вводят для снижения онкологической нагрузки у пациента перед операцией или другими процедурами. Альтернативно, их можно вводить после операции, чтобы гарантировать, что любой остающийся рак (например, рак, который хирургическим вмешательством не удалось устранить) погиб.

Терапевтически эффективное количество олигонуклеотида представляет собой заранее определенное количество, рассчитанное для достижения желаемого эффекта, то есть для ингибирования пролиферации раковых клеток. Таким образом, диапазоны доз для введения олигонуклеотидов по данному изобретению достаточно велики для достижения желаемого эффекта. Дозировка не должна быть настолько большой, чтобы вызвать нежелательные побочные реакции, такие как синдромы повышенной вязкости, отек легких, застойная сердечная недостаточность, неврологические эффекты и тому подобное. Обычно доза будет варьироваться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области. Дозировка может быть скорректирована индивидуальным врачом в случае каких-либо осложнений.

Композицию по данному изобретению предпочтительно вводят пациенту парентерально, например, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, внутривенной, внутрибрюшинной, подкожной, внутриплевральной или интратекальной инъекцией или могут быть использованы *ex vivo*. Предпочтительные дозировки составляют между 5-90 мг/м<sup>2</sup>. Введение предпочтительно повторяют по расписанию, пока рак не исчезнет или не регрессирует, и может быть в сочетании с другими формами терапии.

Фармацевтические препараты.

Фармацевтическая композиция, содержащая липосомы, обычно включает стерильный фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, такой как вода или физиологический раствор.

В тех случаях, когда проводится клиническое применение нейтрального липидного компонента (например, в форме липосомы), содержащего олигонуклеотид, обычно полезно получить липидный комплекс в виде фармацевтической композиции, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, это повлечет за собой приготовление фармацевтической композиции, которая по существу не содержит пирогенов, а также любых других примесей, которые могут быть вредными для людей или животных. Можно также использовать соответствующие буферы для придания комплексу стабильности и обеспечения возможности поглощения клетками-мишенями.

Фразы "фармацевтический или фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают побочную, аллергическую или другую неблагоприятную реакцию при введении животному, такому как человек, в зависимости от ситуации. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один незаряженный липидный компонент, включающий олигонуклеотид или дополнительный активный ингредиент, будет известно специалистам в данной области в свете данного описания, примером которого является Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005, включенный в данный документ в качестве ссылки. Кроме того, для введения животному (например, человеку) следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление биологических стандартов FDA.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие абсорбцию, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связующие вещества, наполнители, дезинтегрирующие агенты, смазывающие вещества, подслащивающие агенты, ароматизаторы, красители, такие как материалы и их комбинации, как известно специалисту в данной области. Фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно составляется для введения человеку, хотя в некоторых вариантах осуществления изобретения может быть желательно использовать фармацевтически приемлемый носитель, который составлен для введения животному, не являющемуся человеком, но который не будет приемлемым (например, из-за правительственного регулирования) для введения человеку. За исключением случаев, когда какой-либо

обычный носитель несовместим с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических или фармацевтических композициях.

Фактическое дозированное количество композиции по данному изобретению, вводимой пациенту или субъекту, может определяться физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть состояния, тип заболевания, которое лечат, предыдущими или одновременными терапевтическими вмешательствами, идиопатией пациента и путем введения. В любом случае, специалист, ответственный за введение, будет определять концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта.

В определенных вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции могут включать, например, по меньшей мере около 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления изобретения, активное соединение может составлять, например, между от около 2% до около 75% от веса единицы или между от около 25% до около 60%, и любой диапазон, полученный в нем. В других неограничивающих примерах доза также может составлять от около 1 микрограмм/кг/вес тела, около 5 микрограмм/кг/вес тела, около 10 микрограмм/кг/вес тела, около 50 микрограмм/кг/вес тела, около 100 микрограмм/кг/вес тела, около 200 микрограмм/кг/вес тела, около 350 микрограмм/кг/вес тела, около 500 микрограмм/кг/вес тела, около 1 миллиграмма/кг/вес тела, около 5 миллиграмм/кг/вес тела, около 10 миллиграмм/кг/вес тела, около 50 миллиграмм/кг/вес тела, около 100 миллиграмм/кг/вес тела, около 200 миллиграмм/кг/вес тела, около 350 миллиграмм/кг/вес тела, около 500 миллиграмм/кг/вес тела, до около 1000 мг/кг/вес тела или более на введение, и любой диапазон, получаемый в нем. В неограничивающих примерах выводимого диапазона от чисел, перечисленных в данном документе, диапазон от около 5 мкг/кг/вес тела до около 100 мг/кг/вес тела, около 5 микрограмм/кг/вес тела до около 500 миллиграмм/кг/вес тела и т.д. может быть введен.

Олигонуклеотид по данным вариантам осуществления можно вводить в дозе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более мкг нуклеиновой кислоты на дозу. Каждая доза может иметь объем 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 или более мкл или мл.

Растворы терапевтических композиций могут быть приготовлены в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, их смесях и маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Терапевтические композиции по данному изобретению можно вводить в форме инъектируемых композиций в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения в, или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Эти препараты также могут быть эмульгированы. Типичная композиция для этой цели содержит фармацевтически приемлемый носитель. Например, композиция может содержать 10 мг, 25 мг, 50 мг или до около 100 мг человеческого сывороточного альбумина на миллилитр забуференного фосфатом солевого раствора. Другие фармацевтически приемлемые носители включают водные растворы, нетоксичные наполнители, в том числе соли, консерванты, буферы и тому подобное.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и инъектируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, солевые растворы, парентеральные носители, такие как хлорид натрия, декстроза Рингера и т.д. Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ. Консерванты включают antimicrobные агенты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и инертные газы. pH и точная концентрация различных компонентов фармацевтической композиции регулируются в соответствии с хорошо известными параметрами.

Терапевтические композиции по данному изобретению могут включать классические фармацевтические препараты. Введение терапевтических композиций согласно данному изобретению будет осуществляться любым общепринятым путем, если ткань-мишень доступна по этому пути. Этот путь включает в себя оральный, назальный, буккальный, ректальный, вагинальный или местный. Местное введение может быть особенно полезным для лечения рака кожи, для предотвращения алопеции, вызванной химиотерапией, или другого кожного гиперпролиферативного расстройства.

Альтернативно, введение может быть ортотопическим, внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшинным или внутривенным введением. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, которые включают физиологически приемлемые носители, буферы или другие наполнители. Для лечения состояний легких может использоваться аэрозольная доставка. Объем аэрозоля составляет от между около 0,01 до 0,5 мл.

Эффективное количество терапевтической композиции определяется исходя из намеченной цели. Термин "единичная доза" или "дозировка" относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения у субъекта, причем каждая единица содержит заранее определенное количество терапевтической композиции, рассчитанной для получения желаемых ответов, обсуждаемых выше в связи с ее введением, т.е. соответствующим путем и режимом лечения. Количество, которое следует вводить, в зависимости от количества обработок и стандартной дозы, зависит от желаемой защиты или эффекта.

Точные количества терапевтической композиции также зависят от суждения практикующего врача и являются индивидуальными для каждого человека. Факторы, влияющие на дозу, включают физическое и клиническое состояние пациента, путь введения, предполагаемую цель лечения (например, облегчение симптомов по сравнению с излечением) и эффективность, стабильность и токсичность конкретного терапевтического вещества.

Комбинированные лечения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы по данному изобретению включают введение ингибирующего олигонуклеотида или олигонуклеотида, способного экспрессировать ингибитор экспрессии гена, в сочетании со второй или дополнительной терапией. Способы и композиции, включая комбинированную терапию, усиливают терапевтический или защитный эффект и/или увеличивают терапевтический эффект другой противораковой или антигиперпролиферативной терапии.

Терапевтические и профилактические способы и композиции могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для достижения желаемого эффекта, такого как уничтожение раковой клетки и/или ингибирование клеточной гиперпролиферации. Этот процесс может включать приведение в контакт клеток с ингибитором экспрессии генов и второй терапией, такой как ингибитор тирозинкиназы (например, иматиниб, нилотиниб, дасатиниб, бозутиниб, понатиниб или бафетиниб) или аналог цитидина (например, децитабин, цитарабин или азациитидин). Ткань, опухоль или клетка могут контактировать с одной или более композициями или фармакологическим препаратом(ами), включающими один или более агентов (т.е. ингибитор экспрессии генов или противораковый агент), или путем контакта с тканью, опухолью и/или клеткой с двумя или более различными композициями или составами, причем одна композиция обеспечивает 1) ингибирующий олигонуклеотид; 2) противораковый агент или 3) как ингибирующий олигонуклеотид, так и противораковый агент. Также предполагается, что такая комбинированная терапия может использоваться в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, хирургической терапией или иммунотерапией.

Ингибиторный олигонуклеотид может быть введен до, во время, после или в различных комбинациях относительно противоракового лечения. Введение может осуществляться с интервалами от одновременно минут до дней или недель. В вариантах осуществления изобретения, где ингибирующий олигонуклеотид предоставляется пациенту отдельно от противоракового агента, обычно гарантируется, что значительный период времени не истекает между временем каждой доставки, так что эти два соединения все еще будут способны оказывать выгодно комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагается, что можно обеспечить пациента ингибирующей олигонуклеотидной терапией и противораковой терапией в течение от около 12 до 24 или 72 часов друг от друга и, более предпочтительно, в течение около 6-12 часов друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным значительно увеличить период лечения, который составляет от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) промежутка между соответствующими введениями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, курс лечения будет длиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 дней или более. Предполагается, что один агент можно вводить в день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 и/или 90, любая их комбинация и другой агент предоставляется в день 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 и/или 90, или любая их комбинация. В течение одного дня (24-часовой период) пациенту может быть назначен один или более приемов препарата(ов). Кроме того, после курса лечения предполагается, что существует период времени, в течение которого не вводится противораковое лечение. Этот период времени может длиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней и/или 1, 2, 3, 4, 5 недель и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более, в зависимости от состояния пациента, такого как его прогноз, сила, здоровье и т.д.

Различные комбинации могут быть использованы. Для приведенного ниже примера ингибирующая терапия олигонуклеотидами обозначена как "А", а противораковая терапия - "В": А/В/А В/А/В В/В/А А/А/В А/В/В В/А/А А/В/В/В В/А/В/В В/В/В/А В/В/А/В А/А/В/В А/В/А/В А/В/В/А В/В/А/А В/А/В/А В/А/А/В А/А/А/В В/А/А/А А/В/А/А А/А/В/А.

Введение любого соединения или терапии по данному изобретению пациенту будет следовать общим протоколам введения таких соединений, принимая во внимание токсичность агентов, если таковые имеются. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения существует этап мониторинга токсичности, который относится к комбинированной терапии.

Ожидается, что циклы лечения будут повторяться по мере необходимости. Также предполагается, что различные стандартные способы лечения, а также хирургическое вмешательство могут применяться в сочетании с описанной терапией.

В конкретных аспектах предполагается, что стандартная терапия будет включать химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, хирургическую терапию или генную терапию и может применяться в сочетании с ингибитором генной экспрессионной терапии, противораковой терапией или одновременно с ингибитором генной экспрессионной терапии и противораковой терапией, как описано в данном документе.

#### Химиотерапия.

В соответствии с данными вариантами осуществления может использоваться широкий спектр химиотерапевтических агентов. Термин "химиотерапия" относится к применению лекарств для лечения рака. "Химиотерапевтический агент" используется для обозначения соединения или композиции, которые вводят при лечении рака. Эти агенты или лекарственные средства классифицируются по способу их активности в клетке, например, влияют ли они и на какой стадии на клеточный цикл. Альтернативно, агент может быть охарактеризован на основании его способности непосредственно сшивать ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические аберрации, влияя на синтез нуклеиновой кислоты.

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтре-тамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (такие как булатацин и булатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекана); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезина, карзелезина и бизелезина); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элейтеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотный иприт, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид окиси мехлорэтаммина, мелфалан, новембихин, фенестерин, предни-мустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энедининовые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неопкарцинонстатининовый хромофор и родственные хромопротеиновые энедининовые антибиотические хромофоры, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцеломидин, митомицины, такие как митомицин С, микофенолоксид, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, децитабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калуостерон, дромостанолон пропionate, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон; антиадреналовые средства, такие как митотан и трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; элиптиниум ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинид; мейтансиноиды, такие как мейтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; ПСК полисахаридный комплекс; разоксан; ризоксин; сизофирин; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлоротриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; таксоиды, например паклитаксел и доцетаксел гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платины; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклевулиновая кислота; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДФМО); ингибиторы тирозинкиназы, такие как иматиниб, нилотиниб, дазатиниб, бозутиниб, понатиниб и бафетиниб; ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарбазин, пликомидин, гемцитабин, навелбиен, ингибиторы фарнезил-протеин-трансферазы, трансплатин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного.

#### Радиотерапия.

Другие факторы, которые вызывают повреждение ДНК и широко используются, включают так называемые  $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Также рассматриваются другие формы факторов, повреждающих ДНК, такие как микроволны, облуче-

ние протонным пучком (пат. США № 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Скорее всего, все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, на репликацию и репарацию ДНК, а также на сборку и поддержание хромосом. Диапазон доз для рентгеновских лучей варьируется от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение продолжительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз для радиоизотопов варьируются в широких пределах и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения и поглощения непластическими клетками.

Термины "контактировал" и "подвергается воздействию" применительно к клетке используются в данном документе для описания процесса, с помощью которого терапевтическая конструкция и химиотерапевтический или радиотерапевтический агент доставляются в клетку-мишень или помещаются в прямое совмещение с клеткой-мишенью. Например, для достижения гибели клеток оба агента доставляются в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

Иммунотерапия.

В контексте лечения рака иммунотерапия, как правило, полагается на использование иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и уничтожения раковых клеток. Трастузумаб (Герцептин™) является таким примером. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное для какого-либо маркера на поверхности опухолевой клетки. Одно антитело может служить эффектором терапии или может рекрутировать другие клетки для фактического уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическое средство, радионуклид, цепь рицина А, холерный токсин, коклюшный токсин и т.д.) и служит просто в качестве нацеливающего агента. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая взаимодействует, прямо или косвенно, с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и НК клетки. Комбинация терапевтических способов, то есть прямой цитотоксической активности и ингибирования или снижения ErbB2, обеспечит терапевтическую пользу при лечении рака со сверхэкспрессией ErbB2.

Другая иммунотерапия может также использоваться как часть комбинированной терапии с геной терапией сайленсинга, которая обсуждалась выше. В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна иметь некоторый маркер, который поддается нацеливанию, то есть не присутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте данного изобретения. Распространенные опухолевые маркеры включают карциноэмбриональный антиген, специфический антиген простаты, ассоциированный с опухолью мочевого пузыря антиген, фетальный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиллоисский антиген, MucA, MucB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Иммуностимулирующие молекулы также существуют, включая цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12, GM-CSF, гамма-ИФН, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, ИЛ-8, и факторы роста, такие как FLT3 лиганд. Было показано, что объединение иммуностимулирующих молекул в виде белков или использование доставки генов в сочетании с опухолевым супрессором демонстрируют усиление противоопухолевых эффектов. Кроме того, антитела против любого из этих соединений могут быть использованы для нацеливания противораковых агентов, обсуждаемых в данном документе.

Примерами иммунотерапии, которая в данное время исследуется или используется, являются иммунные адьюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (пат. США № 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), терапия цитокинами, например, интерферонами  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ; генная терапия ИЛ-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998), например, TNF, ИЛ-1, ИЛ-2, p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward и Villaseca, 1998; патент США № 5830880 и 5846945) и моноклональные антитела, например, анти-ганглиозид GM2, анти-HER-2, анти-p185 (Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; пат. США № 5824311). Предполагается, что одна или более противораковых терапий могут быть использованы с описанными в данном документе генными терапиями сайленсинга.

При активной иммунотерапии вводят антигенный пептид, полипептид, или белок, или композицию аутогенных или аллогенных опухолевых клеток, или "вакцину", как правило, с отдельным бактериальным адьювантом (Ravindranath and Morton, 1991; Morton et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Mitchell et al., 1993).

При адаптивной иммунотерапии циркулирующие лимфоциты пациента или опухолевые инфильтрированные лимфоциты, выделенные *in vitro*, активируются лимфокинами, такими как ИЛ-2, или трансдуцируются генами некроза опухолей, и повторно вводятся (Rosenberg et al., 1988; 1989).

Хирургия.

Приблизительно 60% больных раком будут подвергаться хирургическому вмешательству определенного типа, которое включает в себя профилактические, диагностические или операции для определения стадийности, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия - это лечение рака, которое

может использоваться в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение по данному изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные способы лечения.

Лечебная хирургия включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или разрушается. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли лечение хирургическим путем включает лазерную хирургию, криохимию, электрохирургию и микроскопически контролируемую хирургию (хирургия Моса). Кроме того, предполагается, что данное изобретение может быть использовано в сочетании с удалением поверхностно расположенных раков, предраковых состояний или случайных количеств нормальной ткани.

При удалении части или всех раковых клеток, тканей или опухоли в теле может образовываться полость. Лечение может быть достигнуто перфузией, прямой инъекцией или местным применением области с дополнительной противораковой терапией. Такое лечение может повторяться, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти способы лечения могут также варьироваться.

Другие агенты.

Предполагается, что другие агенты могут быть использованы в сочетании с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления изобретения для улучшения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные агенты включают агенты, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и GAP-соединений, цитостатические и дифференцирующие агенты, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптотическим индукторам или другие биологические агенты. Увеличение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения числа GAP-соединений увеличит антигиперпролиферативные эффекты на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления изобретения, цитостатические или дифференцирующие агенты могут использоваться в сочетании с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления изобретения для улучшения антигиперпролиферативной эффективности лечения. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность данных вариантов осуществления изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы фокальной адгезионной киназы (ФАК) и ловастатин. Кроме того, предполагается, что другие агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело с225, можно использовать в сочетании с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления изобретения для улучшения эффективности лечения.

### Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что методики, описанные в следующих примерах, представляют методики, открытые изобретателем для эффективного функционирования при практическом использовании изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие предпочтительные способы его применения. Однако специалистам в данной области техники в свете данного описания должно быть понятно, что в конкретных вариантах осуществления изобретения, которые описаны, могут быть сделаны многие изменения, и все же получен подобный или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1. Фаза I исследования ВР1001 (антисмысловой липосомальный Grb2) у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями.

Необходимый для передачи сигналов раковым клеткам связанный с рецептором фактора роста белок-2 (Grb2) используется онкогенными тирозинкиназами для активации Ras и ERK. ВР1001 является антисмыслом, включенным в липосомы, который ингибирует экспрессию Grb2. Цель исследования - определить безопасность, максимальную переносимую дозу (МТD), фармакокинетику и противолейкозную активность ВР1001 у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями.

Лекарственное вещество ВР1001 и введение.

Последовательность антисмыслового олиго Grb2 представляет собой: 5'-ATA TTT GGC GAT GGC TTC-3' (SEQ ID NO: 1), которая нацелена на кодоны 2-7 мРНК grb2 человека. Антисмысловой олиго Grb2, состоящий из модификации Р-этоксид олиго, был изготовлен Nitto Denko Avecia, Inc. (8560 Реддинг-роуд, Цинциннати, Огайо, 45215, США). Антисмысловой олиго Grb2 вводили в липид 1,2-диолеил-3-фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, Алабама, США) по протоколу лиофилизации. ВР1001 готовили в виде порошка лекарственного средства по 5 мг и хранили при 4°C. В день инфузии препарата добавляли два мл 0,9% физиологического раствора для достижения конечной концентрации ВР1001 2,5 мг/мл. Участникам вводили от 2 до 3 часов внутривенной (в/в) инфузии ВР1001 два раза в неделю (каждые 3 или 4 дня) в течение 28 дней. Участникам может быть предоставлено до 6 циклов лечения, если они продолжают получать пользу от лечения.

Пациент и дизайн исследования. Исследование было разработано как стандартное исследование с повышением дозы 3+3 для оценки безопасности, фармакокинетики и эффективности ВР1001 у взрослых

пациентов с диагнозом рефрактерный/рецидивирующий ХМЛ или ОЛЛ, ОМЛ или МДС с положительной Филадельфийской хромосомой. Группы трех пациентов были включены на каждом уровне дозы. Начальная доза ВР1001 составляла 5 мг/м<sup>2</sup> (группа 1). Если у одного пациента развилась токсичность 3-й степени или выше, на этом уровне дозы прибавляли еще трех пациентов. Если у двух или более пациентов развилась токсичность 3 степени или выше, этот уровень дозы считался токсичным. Максимальная переносимая доза (MTD) была определена как доза, меньшая, чем та, которая вызывает ограничивающую дозу токсичность у двух или более пациентов. Токсичность оценивали с использованием общих терминологических критериев для нежелательных явлений

Национального института рака (NCI CTCAE, версия 3.0). Если не наблюдалось дозозависимой токсичности (DLT), пациенты были бы последовательно включены в группу 2 (10 мг/м<sup>2</sup>), группу 3 (20 мг/м<sup>2</sup>), группу 4 (40 мг/м<sup>2</sup>), группу 5 (60 мг/м<sup>2</sup>), или группу 6 (90 мг/м<sup>2</sup>).

После завершения группами 1-6 фазы I одного агента ВР1001 была изучена безопасность и эффективность комбинации ВР1001 и цитарабина в низких дозах (фаза Ib). ВР1001 вводили в/в в виде 60 мг/м<sup>2</sup> (группа 7) или 90 мг/м<sup>2</sup> (группа 8). Пациентам делали три инъекции ВР1001 перед тем, как подкожно вводить 20 мг низкой дозы цитарабина (LDAC), два раза в день в течение 10 дней подряд. Это исследование было зарегистрировано в ClinicalTrials.gov, номер NCT01159028.

Оценка периферической крови и костного мозга. Оценки периферической крови проводились в начале исследования (в течение 14 дней с начала исследования), а также в дни 1, 8, 15, 22, по завершении первого цикла и в соответствии с клиническими показаниями. Оценка костного мозга проводилась в начале исследования (в течение 14 дней с начала исследования), в конце первого цикла, цикла 2 и в соответствии с клиническими показаниями. Исходные цитогенетические данные были получены до лечения. Молекулярный анализ был проведен для выявления соматических мутаций на исходном уровне костного мозга.

Проточная цитометрия. Периферическая кровь собиралась у пациентов в группах 3, 4, 5 и 6, а затем была получена дозировка в цикл 1 день 1, 8, 15 и 22 и Цикл 2 День 1. Белые кровяные клетки выделяли из периферической крови с использованием пробирок для приготовления клеток BD Vacutainer CPT с гепарином натрия (BD Dickinson), фиксировали и хранили в морозильной камере при -80°C. Проточную цитометрию использовали для определения уровней Grb2 и фосфорилированного Erk1,2 (pErk) в клетках, экспрессирующих CD33, с использованием валидированного способа (Flow Contract Site Laboratory, Ботел, Вашингтон, США).

Фармакокинетический сбор образцов и анализ проб. Образцы крови для измерения концентрации антисмысловых олиго Grb2 были собраны у пациентов в группах 7 и 8, до введения, через 1, 2, 4, 6, 8, 24, 72 ч после начала инфузии (SOI - start-of-infusion). Образцы мочи для измерения концентраций ВР1001 были также отобраны у пациентов в группах 7 и 8, в начале дозы через 4 часа, через 4-8 часов после введения, и 8-24 часов после введения. ФК образцы крови обрабатывали до плазмы и анализировали с использованием валидированного способа (Charles River Laboratories, Монреаль, Канада) с нижним пределом количественного определения (LLOQ; 0,5 нг/мл). Образцы мочи анализировали с использованием валидированного способа (Charles River Laboratories, Монреаль, Канада) с LLOQ 1,00 нг/мл.

Параметры ФК оценивали с использованием фармакокинетического программного обеспечения Phoenix (Certara). Для оценки параметров использовали некомпартментальный подход, совместимый с в/в инфузионным путем введения, с использованием предполагаемого времени инфузии 2,5 часа. Все параметры были получены из индивидуальных концентраций антисмыслового олиго Grb2 в плазме с 1-го дня цикла 1, когда это практически осуществимо. Цикл 1, день 1, значения концентрации до введения дозы были <LLOQ и, следовательно, значение времени ноль принималось равным нулю. Параметры оценивались с использованием номинального времени отбора проб относительно начала инфузии. Площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) была рассчитана с использованием линейного трапециевидного способа с линейной интерполяцией. Наклон фазы терминальной элиминации определяли с использованием логарифмической линейной регрессии на невзвешенных данных о концентрации. Параметры, основанные на определении конечной фазы исключения, не сообщались, если коэффициент детерминации (R<sup>2</sup>) был менее чем 0,800 или если экстраполяция AUC на бесконечность (% AUC<sub>extrap</sub>) составляла более 20% от общей площади.

Параметры, оцененные по плазме: T<sub>max</sub> - время после дозирования, при котором наблюдалась максимальная наблюдаемая концентрация; C<sub>max</sub> - максимальная наблюдаемая концентрация, измеренная после дозирования; T<sub>1/2</sub>, видимый терминальный период полувыведения; AUC<sub>(0-24)</sub>, AUC от дозировки до 24 ч после введения; AUC<sub>(0-t)</sub>, AUC от дозирования до времени после дозирования, при котором наблюдалась последняя количественно определяемая концентрация; AUC<sub>(0-inf)</sub>, расчетный AUC от дозирования до бесконечности; CL - кажущаяся степень выведения Grb2 антисмыслового олиго; Vz, кажущийся объем распределения Grb2 антисмыслового олиго.

Оценка параметров мочи проводилась с использованием Microsoft Excel. Все параметры были получены из индивидуальных концентраций антисмыслового олиго Grb2 в моче с дня 1 цикла 1. Указанные параметры были: Общее U - совокупное количество антисмыслового олиго Grb2, выделенного с мочой за весь период отбора проб; CL<sub>r</sub> - почечный клиренс относительно плазмы; процент восстановленного, от-

носительное количество антисмыслового олиго Grb2, выделяемого с мочой, по сравнению с общим введенным лекарственным средством.

Статистический анализ. Анализ ФК, а также генерация таблиц и графиков были сгенерированы Phoenix версии 1.4. Описательные статистические данные (N, среднее арифметическое, стандартное отклонение) для соответствующих переменных группировки и сортировки были получены с использованием Phoenix версии 1.4 и Microsoft Excel 2007.

Цели исследования. Основные цели исследования фазы I BP1001 заключались в определении токсичности и переносимости возрастающих доз BP1001 в качестве терапии одним агентом; определении максимальной переносимой дозы (MTD) BP1001; и определении токсичности и толерантности BP101 в сочетании с низкими дозами цитарабина (Ara-C; фаза Ib). Вторичные цели исследования фазы I BP1001 заключались в определении оптимальной биологически активной дозы (OBAD; определяется как 50% снижение экспрессии Grb2 в циркулирующих клетках лейкемии); определении *in vivo* фармакокинетики BP1001; и оценке ответа опухоли.

Критерии включения и исключения. В обеих частях исследования использовался открытый последовательный дизайн с повышением дозы для оценки безопасности, переносимости и токсичности, ФК, опухолевого ответа и антилейкозной активности. Критерии включения были: как минимум 18 лет; иметь трудно поддающийся лечению или замененный ОМД, Ph+ХМЛ, ОЛЛ или МДС; отказ от противораковой терапии в течение по крайней мере двух недель до начала исследования (за исключением гидроксимочевины или анагрелида (24 часа), ТК1 95 дней) и интерферона (2 недели); наличие адекватных функций печени и почек (ALT <2x ULN, креатинин сыворотки <2x ULN, билирубин сыворотки <2x ULN); и имеющий показатели ECOG 0-2. Критерии исключения: наличие серьезных интеркуррентных заболеваний, которые могут повлиять на способность пациента выполнять программу лечения; и получение другого исследуемого продукта в течение более 14 дней или 5 периодов полураспада предыдущего продукта.

Характеристики пациента. Всего в исследование было включено 39 пациентов: 13 пациентов (группа 1), 6 пациентов (группа 2), 3 пациента (группа 3), 3 пациента (группа 4), 3 пациента (группа 5), 4 пациента (группа 6), 4 пациента (группа 7) и 3 пациента (группа 8). У пяти пациентов была диагностирована бластная фаза ХМЛ, у 30 пациентов с ОМЛ и у 4 пациентов с МДС (табл. 3.1). Средний возраст пациентов составлял 66 лет, в возрасте от 32 до 89 лет. Двадцать семь были пациентами мужского пола и двенадцать были пациентками женского пола. До включения пациенты получали в среднем четыре схемы. Их средний статус общего состояния был 1.

Среднее количество бластов периферической крови составляло 15%, в диапазоне от 0 до 96%. Как и ожидалось, у этих пациентов была разнообразная цитогенетика, которая включала: t (9; 22) (n=7), диплоидный (n=12), комплексный (n=10), смешанный (n=13). У двух пациентов был t (9;22)-позитивный ХМЛ и комплексная цитогенетика, в то время как у одного пациента был t (9; 22)-позитивный ОМЛ.

Нежелательные явления у поддающихся оценке пациентов. Из 39 пациентов 27 пациентов были оценены. Двенадцать пациентов не смогли завершить полный цикл из-за прогрессирования заболевания и были заменены в соответствии с протоколом (табл. 4). Из 27 оцениваемых пациентов 21 пациент получал терапию одним агентом BP1001, а 6 пациентов получали комбинированную терапию BP1001+LDAC. Как показано в табл. 8, у поддающихся оценке пациентов были различные молекулярные аномалии в их лейкозах, которые включали ASXL1 (n=1), BCR-ABL (n=2; включая T315I в 1), CEBPA (n=4), DNMT3A (n=1), FLT-ITD (n=2), IDH1/2 (n=3), JAK2 (n=2), NOTCH1 (n=1), NPM1 (n=2), NRAS (n=2), TET2 (n=2), TP53 (n=2). Характеристики включенных пациентов приведены в табл. 3.1.

Только один пациент при дозе 5 мг/м<sup>2</sup> испытывал дозоограничивающую токсичность (ДОТ), воспаление слизистой оболочки 3 степени и синдром "кисть-стопа", во время принятия высокой дозы гидроксимочевины для лечения пролиферативного ХМЛ-БФ. Исследуемый препарат не может быть исключен как способствующий фактор, поэтому об этом событии было сообщено как ДОТ. После расширения до 6 пациентов, ни у одного пациента не развилось ДОТ. Другой лекарственной токсичности не наблюдалось ни у одного из пролеченных пациентов. МПД не была идентифицирована. НТД для BP1001 составляет 90 мг/м<sup>2</sup>.

Таблица 3.1. Характеристики включенного пациента

Характеристики	Все пациенты (n=39) <sup>a</sup>	Фаза I (n=32) <sup>a</sup>	Фаза Ib (n=7) <sup>a</sup>
Средний возраст (лет)	66 (32-89)	63 (32-89)	72 (69-85)
Пол			

Мужчина	27	22	5
Женщина	12	10	2
Количество предыдущих схем	4 (1-8)	4 (1-8)	1 (1-4)
Диагноз при включении в исследование			
ОМЛ	30	24	6
ХМЛ (бластная фаза)	5	4	1
МДС	4	4	0
Общее состояние	1 (0-2)		
Среднее, лейкоциты ( $\times 10^6$ мл)	3 (0,2-40)		
Среднее периферических бластов (%)	15 (0-96)		
Средний гемоглобин (г/мл)	9 (8-11)		
Средние тромбоциты ( $\times 10^6$ мл)	21 (4-155)		
Цитогенетика			
t(9;22)	7 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>	1
Диплоид	12	8	4
Смешанный	13	12	1
Комплексный	10	9	1

<sup>a</sup> - данные - это n (диапазон) или % (диапазон), если не указано иное,  
<sup>b</sup> - у двух пациентов был t(9; 22)-позитивный ХМЛ и комплексная цитогенетика, а у одного пациента был t(9; 22)-позитивный ОМЛ.

Таблица 4. Пациенты и доза на группу

Группа	ВР1001 (мг/м <sup>2</sup> )	Ara-C	Количество подвергшихся лечению	Количество оцениваемых
1	5	Нет	13	6
2	10	Нет	6	3
3	20	Нет	3	3
4	40	Нет	3	3
5	60	Нет	3	3
6	90	Нет	4	3
7	60	Да	4	3
8	90	Да	3	3

Фармакокинетика антисмыслового олиго Grbz. Нижний предел количественного определения (LLOQ) концентрации антисмыслового олиго Grb2 в плазме составляет 0,50 нг/мл. В момент времени перед исследованием не было количественно определяемой концентрации антисмыслового олиго Grb2. Уровни антисмыслового олиго Grb2 в плазме снижались в два раза по экспоненте (фиг. 1). Максимальная концентрация антисмыслового олиго Grb2 в плазме наблюдалась через 1 ч после инфузии (фиг. 1). Через 72 часа после инфузии уровни антисмыслового олиго Grb2 в плазме были ниже LLOQ или немного выше его (фиг. 1).  $T_{1/2}$  в плазме антисмыслового олиго Grb2 в плазме варьировалось от 22,2 до 37,7 ч для дозы 60 мг/м<sup>2</sup> и от 4,64 до 14,2 ч для дозы 90 мг/м<sup>2</sup> (табл. 5).  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-24)}$ ,  $AUC_{(0-t)}$  и  $AUC_{(0-inf)}$  были одинаковыми для обоих уровней дозы, несмотря на увеличение дозы в 1,5 раза с 60 до 90 мг/м<sup>2</sup> (табл. 5).  $V_z$  уменьшился примерно в 1,5 раза, а  $CL$  увеличился примерно в 1,5 раза при увеличении дозы с 60 до 90 мг/м<sup>2</sup> (табл. 5).

Таблица 5. Концентрация ВР1001 в плазме после однократной в/в инфузии ВР1001

Субъект (группа)	ВР1001 (мг/м <sup>2</sup> )	t <sub>1/2</sub> (ч)	C <sub>max</sub> (нг/мл)	AUC <sub>0-24</sub> (ч·нг/мл)	AUC <sub>0-t</sub> (ч·нг/мл)	AUC <sub>0-inf</sub> (ч·нг/мл)	Vz (л)	CL (л/ч)
35 (7)	60	22,2	110	419	490	513	3750	117
37 (7)		37,7	69	291	404	496	6570	121
38 (7)		25,9	68	294	349	375	5980	160
Среднее		29,6	82	335	414	461	5433	133
SD		8,1	24	73	71	75	1487	24
39 (8)	90	4,6	118	491	490	501	1200	180
40 (8)		14,2	106	471	580	599	3070	150
41 (8)		13,7	53	269	307	317	5600	284
Среднее		11,8	82	410	459	472	3290	205
SD		5,4	24	122	139	14	2208	70

Количество антисмыслового олиго Grb2, выделенного в моче, по сравнению с общей введенной дозой варьировало от 0,04 до 3,23% для дозы 60 мг/м<sup>2</sup> и от 0,36 до 4,77% для дозы 90 мг/м<sup>2</sup>. Средние концентрации антисмыслового олиго Grb2 в моче были выше в группе 90 мг/м<sup>2</sup>, чем в группе 60 мг/м<sup>2</sup> (табл. 6).

Таблица 6. Концентрация ВР1001 в моче после однократной в/в инфузии ВР1001

Субъект (группа)	ВР1001 (мг/м <sup>2</sup> )	Общее U (мг)	CL <sub>r</sub> из плазмы (мл/ч)	% восстановленного
35 (7)	60	1,49	4220	1,44
37 (7)		0,06	195	0,04
38 (7)		4,27	14500	3,23
Среднее		1,94	6305	1,57
SD		2,14	7377	1,60
39 (8)	90	4,27	8720	2,44
40 (8)		8,34	17700	4,77
41 (8)		0,46	8600	0,36
Среднее		4,36	11673	2,52
SD		3,94	5220	2,21

ВР1001 снижал уровни Grb2 и фосфорилированного Erk1,2 (pErk). Проточную цитометрию использовали для определения уровней белков Grb2 и pErk в циркулирующих лейкозных клетках пациентов, которые получали терапию одним агентом ВР1001, и сообщали о ней как о средней интенсивности флуоресценции (MFI). MFI Grb2 и pErk во время лечения сравнивали с таковыми на исходном уровне (табл. 7). На последнем измеренном образце (конец обработки или цикл 1 день 22) ВР1001 снизился ≥25% уровней Grb2 в 10 из 12 образцов, и ≥25% уровней pErk в 7 из 12 образцов. Среднее снижение уровней Grb2 составило 49% (диапазон: от 28 до 91%), а уровень pErk составил 52% (диапазон: от 27 до 91%).

Таблица 7. Снижение уровней Grb2 и pErk после введения ВР1001

Субъект (группа)	ВР1001 (мг/м <sup>2</sup> )	Снижение Grb2 (%)	Снижение pErk (%)	Снижение Grb2 (%)	Снижение pErk (%)
		(День 15)		(День 22 или окончание лечения)	
22 (3)	20	0	0	57	0
23 (3)	20	0	3	28	45
24 (3)	20	56	28	47	35
25 (4)	40	63	82	54	91
26 (4)	40	47	0	0	0
27 (4)	40	NS	NS	34	27
28 (5)	60	0	0	30	54
29 (5)	60	57	51	65	0
30 (5)	60	54	55	43	47
31 (6)	90	0	0	0	0
32 (6)	90	85	54	91	63
34 (6)	90	63	42	40	0

NS=образец не собран.

Противолейкозная активность ВР1001. ВР1001, в качестве терапии одним агентом, уменьшил на >50% бластов периферической крови у 9 из 21 пациента и уменьшил на >50% бластов костного мозга у 3

из 21 пациента (табл. 8). Согласно протоколу, пациенты могут получать лечение ВР1001 на срок до 6 месяцев, если они демонстрировали стабильное заболевание (то есть менее чем на 50% увеличение их лейкоцитов в течение первых 4 недель терапии) или имели улучшение своего заболевания. Четыре пациента завершили 2 цикла лечения, и три пациента завершили 5 циклов лечения (табл. 8). Эти семь пациентов имели различные цитогенетические и молекулярные аномалии, такие как мутации JAK2 и NRAS (табл. 8).

Среди шести оцениваемых пациентов, которые получали комбинированную терапию ВР1001+LDAC, три пациента получали 3 цикла лечения, и один пациент получал 5 циклов лечения (табл. 8). Что еще более важно, три пациента достигли полной ремиссии (бластов костного мозга  $\leq 5\%$ ), а два пациента достигли частичной ремиссии (снижение бластов костного мозга на  $\geq 50\%$ ) (табл. 8; фиг. 2).

Таблица 8. Гематологический опыт оцениваемых пациентов

Субъект	ВР1001 (мг/ м <sup>2</sup> )	Ага-С	DX	Цитогенетика	Молекулярные аномалии	Бласти периферической крови (%)			Бласти костного мозга (%)			Циклов заверш ено
						Исходный уровень	Надир	Off-Rx	Исходный уровень	Надир	Off- Rx	
1	5	Нет	ХМЛ	7q- комплекс	BCR-ABL T315I	93	82	97	78	ND	ND	<1
6*	5	Нет	ОМЛ	диплоид	JAK2	15	2	5	NA	ND	ND	5
7	5	Нет	МДС	20 комплекс	Отрицательный	0	0	0	8	4	6	5
10	5	Нет	ОМЛ	диплоид	Отрицательный	1	0	1	23	10	10	1
11	5	Нет	ХМЛ	Ph+ комплекс	BCR-ABL Y253N, F317V	24	7	50	11	ND	ND	1
14	5	Нет	ОМЛ	диплоид	RAS	48	5	21	33	ND	ND	1
15	10	Нет	ОМЛ	диплоид	FLT-ITD, СЕВРА	54	31	72	85	76	76	1
20	10	Нет	ОМЛ	диплоид	Отрицательный	76	5	63	50	Нет	80	1
21	10	Нет	ОМЛ	Прочее	Отрицательный	71	43	74	40	38	38	2
22	20	Нет	ОМЛ	Прочее	NRAS	1	0	1	8	3	ND	2
23	20	Нет	МДС	5q-	JAK2 V617F	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1**
24	20	Нет	МДС	-7	Не выполнено	0	0	0	NE	NE	NE	5
25	40	Нет	ОМЛ	диплоид	Отрицательный	10	3	19	25	Нет	36	2
26	40	Нет	ОМЛ	Ph+	FLT-ITD, СЕВРА	16	Нет	80	25	Нет	80	1
27	40	Нет	ОМЛ	диплоид	NPM1 экзон 12 IDH1 R132H	93	Нет	97	87	54	ND	1
28	60	Нет	ОМЛ	Прочее	СЕВРА	96	93	98	89	88	88	1
29	60	Нет	ОМЛ	5 и 7 комплекс	Отрицательный	35	7	24	28	ND	ND	1
30	60	Нет	ОМЛ	Прочее	IDH2 R140Q	51	17	82	72	Нет	92	1
31	90	Нет	ОМЛ	8+	Отрицательный	0	0	0	17	Нет	17	1
32	90	Нет	ОМЛ	7q-	NRAS	2	Нет	42	24	22	22	2
34	90	Нет	ОМЛ	5q-	Отрицательный	5	Нет	92	66	ND	ND	1
35	60	Да	ОМЛ	диплоид	Отрицательный	0	0	0	18	2	2	1 (CR)
37	60	Да	ОМЛ	5q-	TP53, NOTCH1	80	13	31	25	25	ND	1
38	60	Да	ОМЛ	диплоид	NPM1, IDH2	4	0	ND	23	2	3	5 (CR)
39	90	Да	ОМЛ	Прочее	DNMT3A, TET2, TP53	70	0	52	36	15	58	3 (PR)
40	90	Да	ОМЛ	диплоид	Отрицательный	0	0	0	31	10	2	3 (CR)
41	90	Да	ОМЛ	диплоид	TET2, СЕВРА, ASXL1	0	0	0	18	9	14	3 (PR)

ND=Не сделано;

NE=BM не поддается оценке для дифференциала или нижнего порога из-за недостатка выборки;

Нет=нет нижнего порога или уменьшения количества бластов,

\* - у пациента 6 был диагностирован миелофиброз с ОМЛ,

\*\* - пациент 23 закончил цикл 1, но был выведен из исследования из-за проблем с лекарственными препаратами.

Пример 2. Эффективность *in vitro* ВР1001 в комбинации с Das.

Клиническая активность ВР1001 будет исследована у пациентов с ХМЛ, находящихся в фазе акселерации или бластной фазе. Реакция пациентов с фазой акселерацией и бластной фазой на иматиниб плохая или кратковременная. Эти пациенты часто лечились другими ингибиторами тирозинкиназы, такими как дазатиниб, nilotinиб, bosutinиб и ponatinиб. Здесь было определено, может ли ВР1001 усиливать ингибирующее действие дазатиниба, nilотиниба, бозутиниба и понатиниба в клетках ХМЛ.

Культура клеток. Клетки BV173 и K562 представляют собой Bcr-Abl-позитивные клеточные линии, полученные у пациентов с ХМЛ. Они были получены от CLS Cell Lines Service GmbH (Эппельхайм, Германия) и культивированы в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой.

Химические вещества. Последовательность антисмыслового олиго Grb2 представляет собой: 5'-АТАТТТГГСГАТГГСТТС-3' (SEQ ID NO: 1). Антисмысловый олиго Grb2 был произведен Avesia (Цинциннати, Огайо, США). ВР1001 был получен Avanti Polar Lipids (Алабастер, Алабама, США), как описано. Вкратце, антисмысловые олиго Grb2 смешивали с диолеилфосфатидилхолиновыми липидами (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США), замораживали и лиофилизировали. Лиофилизат хранили при 4°C. В день эксперимента ВР1001 гидратировали средой и добавляли к клеткам в конечной концентрации от 0 до 120 мкг/мл. Ингибиторы тирозинкиназы, такие как дазатиниб, нилотиниб, бозутиниб и понатиниб, были приобретены у Selleck Chemicals (Хьюстон, Техас, США) в виде 10 мМ исходных растворов ДМСО.

Анализ жизнеспособности клеток. Клетки BV173 и K562 высевали при 5 и  $15 \times 10^3$  клеток/лунка соответственно в 96-луночные планшеты в 0,1 мл среды. Клетки инкубировали с ингибиторами ВР1001 и/или ингибиторами тирозинкиназы в течение 4 дней. Жизнеспособность необработанных и обработанных лейкозных клеток измеряли с помощью анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CellTiter-Glo® (Promega, Мэдисон, Висконсин, США). Анализ жизнеспособности люминесцентных клеток CellTiter-Glo® определяет количество жизнеспособных клеток путем количественного определения наличия АТФ, индикатора метаболически активных клеток.

Анализ клеточного цикла. После инкубации с ВР1001 и/или ингибиторами тирозинкиназы в течение 4 дней клетки BV173 собирали и промывали фосфатным буфером (PBS). Затем клетки фиксировали и пермеабелизировали в течение 1 ч при 4°C с помощью буфера 1X для фиксации/пермеабелизации (Ebioscience, Сан-Диего, Калифорния, США). После пермеабелизации клетки промывали и инкубировали с 7-аминоактиномицином D (7-AAD, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США) в темноте при 4°C в течение около 30 минут. Сбор данных с помощью проточной цитометрии был получен с использованием программного обеспечения BD FACSDiva™ (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Проточный цитометр был настроен на сбор 20000 событий. Относительные проценты в различных фазах клеточного цикла (суб-G1, G1, S, G2/M) были зарегистрированы.

Предварительная обработка ВР1001 усилила ингибирование дазатиниба. Сначала было определено, может ли ВР1001 усиливать ингибирование дазатиниба в клеточных линиях ХМЛ. Чтобы определить, может ли время добавления ВР1001 повлиять на активность дазатиниба, совместную инкубацию ВР1001 и дазатиниба проводили в разных последовательностях: (1) ВР1001 добавляли к клеткам за 1 час до добавления дазатиниба (для имитации лечения в тот же день); (2) ВР1001 добавляли к клеткам через 1 день после обработки клеток дазатинибом; (3) ВР1001 добавляли к клеткам за день до обработки клеток дазатинибом.

Последовательность совместной инкубации (1): ВР1001 и дазатиниб добавлялись в один и тот же день. Клетки K562 и BV173 инкубировали с ВР1001 (0-120 мкг/мл) в течение 1 часа перед обработкой 1 нМ дазатинибом. Через четыре дня определяли эффекты ингибирования роста. В отсутствие и в присутствии 120 мкг/мл ВР1001 дазатиниб снижал жизнеспособность K562 на 25 и 15% соответственно (фиг. 7А). В отсутствие и в присутствии 120 мкг/мл ВР1001 дазатиниб снижал жизнеспособность BV173 на 40 и 49% соответственно (фиг. 7А). Эти данные показывают, что когда клетки ХМЛ обрабатывали ВР1001 и дазатинибом в один и тот же день, ВР1001 оказывал минимальное влияние на ингибирование дазатиниба.

Последовательность совместной инкубации (2): дазатиниб добавлен до ВР1001. Клеточные линии ХМЛ обрабатывали дазатинибом в течение 1 дня с последующей обработкой ВР1001. Жизнеспособность клеток определяли через 3 дня. Дазатиниб снизил жизнеспособность K562 на 12% (Фиг. 7В). Добавление ВР1001 в концентрации 190 мкг/мл снижало жизнеспособность K562 до 50% (Фиг. 7В). Однако при добавлении ВР1001 в концентрации 120 мкг/мл к дазатинибу жизнеспособность K562 снижалась на 25% (фиг. 7В). Дазатиниб снизил жизнеспособность BV173 на 6% (фиг. 7В). Добавление 120 мкг/мл ВР1001 снижало жизнеспособность BV173 на 34% (фиг. 7В). ВР1001, добавленный через 1 день после лечения дазатинибом, дополнительно снижал жизнеспособность BV173. Но не ясно, может ли ВР1001, добавленный через 1 день после лечения дазатинибом, еще больше снизить жизнеспособность K562.

Последовательность совместной инкубации (3): ВР1001 добавлен до дазатиниба. Клеточные линии ХМЛ инкубировали с ВР1001 в течение 1 дня перед обработкой дазатинибом. Только дазатиниб снизил жизнеспособность K562 на 25% (фиг. 7С). Когда к дазатинибу добавляли 120 мкг/мл ВР1001, жизнеспособность K562 снижалась на 44% (фиг. 7С). В отсутствие и в присутствии 120 мкг/мл ВР1001 дазатиниб снижал жизнеспособность BV173 на 10% и 68% соответственно (фиг. 7С). Эти данные показывают, что 1-дневная предварительная обработка ВР1001 усилила ингибирование дазатиниба в обеих клеточных линиях ХМЛ.

ВР1001 усилил индукцию гибели клеток от дазатиниба. Затем мы определили механизм, с помощью которого ВР1001 усиливал ингибирование дазатиниба. Клетки BV173 инкубировали с ВР1001 в течение 1 дня перед обработкой дазатинибом. Три дня спустя клетки собирали и обрабатывали для проточной цитометрии. Основным механизмом ингибирования комбинации ВР1001+дазатиниб была индукция гибели клеток, о чем свидетельствует увеличение процентного содержания клеток в фазе суб-G1

(фиг. 8A-D). Процент клеток в фазе суб-G1 после обработки VP1001, дазатинибом и комбинацией составлял 3,1, 10,6 и 28,0 соответственно (фиг. 8A-D).

Предварительная обработка VP1001 избирательно усиливала индукцию гибели клеток от дазатиниба и nilотиниба. Проточную цитометрию использовали для определения влияния предварительной обработки VP1001 на nilотиниб, бозутиниб и понатиниб. На фиг. 3 показано, что предварительная обработка VP1001 усиливала ингибирование дазатиниба и nilотиниба. Процент клеток в фазе суб-G1 был увеличен с 30,7 до 40,6 для дазатиниба и с 26,4 до 32 для nilотиниба (фиг. 9A). Однако предварительная обработка VP1001 не влияла на ингибирование бозутиниба или понатиниба (фиг. 9A). Процент клеток, обработанных бозутинибом и комбинацией VP1001+бозутиниб в фазе суб-G1, составлял 34,3 и 36,4 соответственно, тогда как для понатиниба и комбинации VP1001+понатиниб составлял 34,0 и 36,0% соответственно (фиг. 9A). Эти данные указывают на то, что предварительная обработка VP1001 избирательно усиливала ингибирование дазатиниба и nilотиниба.

Интересно, что снижение клеточной гибели наблюдалось, когда клетки обрабатывали VP1001 после ингибиторов тирозинкиназы. Процент клеток в фазе суб-G1 был снижен с 64,1 до 51,8 для дазатиниба, с 65,0 до 57,1 для nilотиниба, с 66,1 до 48,6 для бозутиниба и с 71,1 до 51,7 для понатиниба (фиг. 9B).

Пример 3. Фаза Ib/IIa клинического испытания для оценки безопасности, фармакокинетики и эффективности VP1001 в комбинации с дазатинибом (Das) у пациентов с Ph+ ХМЛ в фазе акселерации или бластной фазе.

Обоснование исследования. Исследование фазы Ib включит участников с Ph+ ХМЛ в фазу акселерации или бластную фазу. Участники получат VP1001 плюс Das. Это открытое, простое клиническое исследование. Участники, которые имеют право на получение лечения в исследовании фазы Ib, получат VP1001 (60 мг/м<sup>2</sup> для группы 1 или 90 мг/м<sup>2</sup> для группы 2) и тот же уровень дозы Das (140 мг). Как только доза была определена для фазы IIa, все участники, которые имеют право на получение лечения в фазе IIa, получат одинаковые уровни дозы как для VP1001, так и для Das. Рандомизации не будет для этого исследования.

Каждый цикл лечения будет 28 дней. VP1001 будет вводиться в течение примерно 1-3 часов каждые 2-4 дня (+/-1 день допустимого интервала), начиная с 1-го дня цикла, всего восемь введений в каждом цикле лечения. На 5-й день цикла или около него и не менее чем через 24 ч после завершения приема второй дозы VP1001 участники начнут однократное пероральное введение в день 140 мг Das и продолжат его каждый день после этого без перерыва. Повторные циклы в соответствии с этим режимом будут назначаться каждые 4 недели, пока не случится прогрессирования, рецидива, непереносимости, участник не завершит 6 циклов лечения или участник/исследователь запросит прерывание исследования. Когда участники завершат дозирочную часть исследования, за ними будут следить в течение приблизительно 6 месяцев или до смерти, или завершения исследования, в зависимости от того, что наступит раньше.

Обоснование исследования: Выбор дозы. Предварительные данные показывают, что снижение уровня Grb2 (и потенциальная польза от лейкемии) может быть достигнуто у участников с VP1001 при HTD (90 мг/м<sup>2</sup>) и на один уровень ниже HTD (60 мг/м<sup>2</sup>), и что безопасность/переносимость существенно не отличается между этими двумя дозами. Исходя из этого, безопасность и переносимость сочетания 60 или 90 мг/м<sup>2</sup> VP1001 с Das будут изучены.

В исследовании фазы Ib VP1001 будет вводиться внутривенно (в/в) два раза в неделю (каждые 2-4 дня) с допустимым окном +/-1 день, в течение примерно 1-3 часов, всего восемь доз, назначаемых в течение 28-дневного цикла. Начальная доза будет 60 мг/м<sup>2</sup>, при этом первая доза VP1001 будет назначена на 1-й день каждого 28-дневного цикла. Не менее чем через 24 часа после завершения второй дозы VP1001 участники начнут ежедневную дозировку 140 мг Das и продолжат каждый день после этого без перерыва. Дозирование Das может начаться уже на 5-й день, если оно начато не менее, чем через 24 часа после завершения второй дозы VP1001. Три пациента будут получать VP1001 при каждом уровне дозы в течение 28 дней в отсутствие DLT. Повышение дозы в этой части исследования будет продолжаться до тех пор, пока не будет обнаружен DLT класса 3.

Следующая группа пациентов будет введена в исследование после того, как три пациента из предыдущей группы закончили 28 дневное лечение, без признаков DLT. После этого увеличение дозы будет достигать 90 мг/м<sup>2</sup>. Если один пациент испытывает DLT, эта группа будет расширена еще 3 дополнительными пациентами. Считается, что любая группа, в которой  $\geq 2$  из 3-6 пациентов, получавших лечение DLT, превысила MTD, и непосредственно группа с более низкой дозой будет выбрана для дальнейшего исследования. Все пациенты будут оценены на токсичность в конце лечения (28 дней) с использованием критериев NCI CTCAE. Повторные циклы в соответствии с этим режимом будут назначаться каждые 4 недели, пока не случится прогрессирования, рецидива, непереносимости, участник не завершит 6 циклов лечения или участник/исследователь запросит прерывание исследования.

График лечения фазы IIa будет идентичен исследованию фазы Ib. Тем не менее, всем участникам будут назначены одинаковые дозы VP1001 (определенные в исследовании фазы Ib) и 140 мг Das.

Обоснование исследования: дизайн исследования.

Эффективность и безопасность VP1001 будет оцениваться в сочетании с Das, терапевтическим режимом, хорошо зарекомендовавшим себя при лечении пациентов с Ph+ ХМЛ, находящихся в фазе акселерации или бластной фазе. Основываясь на наших доклинических исследованиях, прогнозируется, что

BP1001 в сочетании с Das принесет пользу пациентам с ХМЛ в фазе акселерации или бластной фазе, которые, как правило, не отвечают на терапию первой линии иматинибом. Дизайн исследования представлен графически на фиг. 3.

В этом исследовании будет использоваться простой открытый дизайн для оценки профиля безопасности, фармакокинетики и эффективности BP1001 в сочетании с Das. В исследовании фазы Ib используется открытый последовательный дизайн с повышением дозы для оценки безопасности, переносимости и токсичности, реакции опухоли и антилейкозной активности.

Будет использоваться стандартная схема "3+3", в которой последовательные группы пациентов с ХМЛ лечат BP1001 в максимально переносимой дозе (MTD) или НТД, если МТД не определен и на 1 уровень ниже МТД (или НТД) в комбинация с фиксированной дозой Das для характеристики безопасности и биологического эффекта, а также для определения рекомендуемой дозы фазы IIa.

Три пациента будут получать BP1001 при каждом уровне дозы в течение 28 дней в отсутствие DLT. Следующая группа пациентов будет введена в исследование после того, как 3 пациента из предыдущей группы закончили 28 дневное лечение, без признаков DLT. После этого увеличение дозы будет достигать 90 мг/м<sup>2</sup>. Если один пациент испытывает DLT, эта группа будет расширена еще 3 дополнительными пациентами. Будет считаться, что любая группа, в которой  $\geq 2$  из 3-6 пациентов, получавших лечение DLT, превысила МТД, и непосредственно группа с более низкой дозой будет выбрана для дальнейшего исследования. Все пациенты будут оценены на токсичность в конце лечения (28 дней) с использованием критериев NCI CTCAE.

Пациенты могут получить продление лечения. Повторные циклы в соответствии с этим режимом будут назначаться каждые 4 недели, пока не случится прогрессирования, рецидива, непереносимости, участник не завершит 6 циклов лечения или участник/исследователь запросит прерывание исследования.

Фаза IIa - это открытое исследование уровня одной дозы. Все участники, которые имеют право на получение лечения в ходе исследования, получают одинаковый уровень дозы для BP1001 (уровень НТД или 1 уровень ниже НТД), как определено в исследовании фазы Ib и Das (140 мг). Рандомизации не будет для этого исследования.

Фаза IIa исследования будет сравнивать эффективность BP1001 в сочетании с Das с историческими показателями ответа, задокументированными только для Das, и оценивать фармакокинетику BP1001, когда он вводится отдельно или в сочетании с Das.

Приблизительно 40 оцениваемых участников получают комбинацию BP1001 с Das на фазе IIa следующим образом. После проверки пригодности в течение периода скрининга участники получают свою начальную дозу BP1001. Доза будет определена в фазе Ib на основе безопасности и переносимости сочетания BP1001 с Das. BP1001 будет назначаться на С1D1 и каждые 2-4 дня после этого, всего 8 доз в течение 28-дневного цикла. На 5-й день цикла или около него и не менее чем через 24 часов после завершения приема второй дозы BP1001 участники начнут принимать пероральную дозу один раз в день, равную 140 мг Das и продолжают ее каждый день после этого без перерыва.

Участники, которые прошли как минимум 3 цикла лечения, будут оценены по их ответу. Целевая доля ответов составляет 35%. Байесовский подход Талла, Саймона, Эстея будет реализован для мониторинга бесполезности. Следующее правило остановки бесполезности будет применяться в размере группы 5, начиная с 5-го пациента:  $\text{prob}\{p(\text{RR}) > 0,35\} < 0,03$ , где  $p(\text{RR})$  обозначает частоту ответа. То есть исследование будет прекращено досрочно из-за бесполезности, если во время исследования мы определим, что есть вероятность менее чем 3%, что RR более чем 35%.

Байесовский подход также будет применен для мониторинга токсичности для включенных пациентов, где токсичность определяется как любая негематологическая токсичность, определенная как DLT, которая, по крайней мере, возможно связана с лечением. Токсичность, обозначаемую как ТОХ, будет контролироваться по байесовским границам остановки, рассчитанным на основе бета-биномиальных распределений. В качестве априорных значений мы принимаем  $p(\text{ТОХ}) \sim \text{бета}(0,6, 1,4)$ . Исследование будет остановлено по причине токсичности, если  $\text{Pr}\{p(\text{ТОХ}) > 0,30 | \text{данные}\} > 0,88$ . То есть мы остановим испытание для включения новых пациентов, если в любое время в ходе исследования мы определим, что существует более чем 88% вероятности того, что уровень токсичности составляет более чем 30%.

Пациенты могут получить продление лечения. Повторные циклы в соответствии с этим режимом будут назначаться каждые 4 недели, пока не случится прогрессирования, рецидива, непереносимости, участник не завершит 6 циклов лечения или участник/исследователь запросит прерывание исследования.

Цели исследования. Основной целью исследования фазы Ib является определение дозозависимой токсичности (DLT) и максимальной переносимой дозы (MTD) BP1001 в сочетании с Das. Основными целями исследования фазы IIa являются оценка фармакокинетики (ФК) и эффективности комбинации BP1001 и Das.

Следующие второстепенные цели этого исследования: оценить безопасность BP1001 в сочетании с Das; определить, обеспечивает ли комбинация BP1001 и Das большую эффективность (гематологический ответ, цитогенетический ответ или молекулярный ответ), чем один Das (путем исторического сравнения); оценить фармакокинетику (ФК) BP1001, если принимать его отдельно или в комбинации с Das; оценить общую выживаемость, время до ответа и продолжительность ответа.

Исследовательская цель этого исследования будет оценивать корреляцию ответа лечения с мутациями домена *abl* киназы.

Исследуемая популяция: Критерии включения. Во время скрининга участники должны соответствовать всем следующим критериям, чтобы считаться подходящими для участия в исследовании:

1) Взрослые возрастом  $\geq 18$  лет.

Женщины должны не иметь потенциала деторождения, быть хирургически стерильными, находится в постменопаузе или использовать адекватные способы контрацепции во время исследования и в течение 30 дней после последней дозы исследуемого препарата или Das.

Мужчины должны согласиться использовать адекватный способ контрацепции во время исследования и в течение не менее 30 дней после последней дозы исследуемого препарата или Das.

Гистологически подтвержденный диагноз Ph+ХМЛ, в фазе акселерации или бластной фазе. Властная фаза определяется как  $\geq 30\%$  бластов в периферической крови или костном мозге, или наличие экстрамедуллярного заболевания, за исключением печени или селезенки. Один из следующих параметров требуется для соответствия критериям для ХМЛ в фазе акселерации:

Бласты в периферической крови или костном мозге  $\geq 15\%$ .

Промиелоциты и бласты в периферической крови или костном мозге  $\geq 30\%$ .

Базофилы РВ или ВМ  $\geq 20\%$ .

Тромбоцитопения  $< 100 \times 10^3/\text{мл}$ , не в результате терапии.

Цитогенетическая клоная эволюция.

Адекватные функции печени и почек, как определено:

аспартаттрансаминаза (АСТ) и аланинтрансаминаза (АЛТ)  $\leq$  в 2,5 раза выше верхнего предела нормы (ULN); и

общий билирубин  $\leq$  в 1,5 раза ULN; и

Расчетная скорость клубочковой фильтрации (pСКФ) не менее 50 мл/мин; формула Кокрофта-Голта будет использоваться для определения pСКФ, когда анализ крови на азот мочевины (BUN) и креатинин проводится в начале исследования. Комбинация сывороточного креатинина pСКФ и BUN будет использоваться для оценки функции почек пациента для обеспечения безопасности.

Уравнение Кокрофта-Голта: расчетный клиренс креатинина =  $[(140 - \text{возраст}) \times \text{общая масса тела}] / (\text{креатинин сыворотки} \times 72)$

Умножьте на 0,85 для женщин.

Документированное общее состояние Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) 0, 1 или 2 (табл. 9).

Выздоровление от последствий любой предшествующей операции, лучевой терапии или противоопухолевого лечения (за исключением алопеции).

Желание и возможность предоставить письменное информированное согласие.

Таблица 9. Общее Состояние ECOG

Класс	ЕСОГ
0	Полностью активный, способный выполнять все, как и до заболевания без ограничений
1	Ограничен в физически тяжелой деятельности, но лечится амбулаторно и может выполнять работу легкого или сидячего характера, например, работу по дому, работу в офисе
2	Лечится амбулаторно и способен на самообслуживание, но не может выполнять какую-либо работу. И около 50% часов бодрствования проводит активно
3	Способный к ограниченному самообслуживанию, прикованный к кровати или креслу более 50% часов бодрствования
4	Полностью неспособен. Не может заниматься самообслуживанием. Полностью прикован к кровати или креслу
5	Мертв

Исследуемая популяция: критерии исключения. Во время скрининга участники, которые соответствуют любому из следующих критериев, будут исключены из исследования.

Пациенты с мутацией T315I не будут исключены, но их ответ будет проанализирован отдельно.

Еще одно первичное злокачественное новообразование, кроме ХМЛ, за последние 2 года, за исключением немеланомного рака кожи или рака шейки матки *in situ*.

Известный активный лептоменингеальный лейкоз, требующий интратекальной терапии.

Примечание: пациенты с заболеванием ЦНС в анамнезе могут быть допущены к участию на осно-

вании, по меньшей мере двух последовательных задокументированных отрицательных оценок спинно-мозговой жидкости перед скринингом.

Изолированный экстрамедуллярный лейкоз, не отвечающий критериям лейкоза костного мозга.

Получение любой противораковой терапии в течение 14 дней после начала лечения ВР1001, за исключением гидроксимочевины или анагрелида или ТК1 (в течение 2 дней).

Неконтролируемая активная, нелеченая или прогрессирующая инфекция.

Получение любого исследуемого агента в течение 14 дней или 5 периодов полужизни от начала ВР1001.

Женщины, которые беременны, имеют положительный тест на беременность или кормят грудью в течение периода скрининга, или намереваются забеременеть или кормить грудью в течение исследования или в течение 30 дней после последней дозы исследуемого препарата.

Предыдущее воздействие ВР1001.

Пациенты с историей нетерпимости к Das или для которых Das может не подходить.

Серьезное интеркуррентное медицинское или психиатрическое заболевание, которое может помешать участнику завершить исследование.

Активная/хроническая инфекция гепатита В (на основе положительного поверхностного антигена [HBsAg]), инфекция гепатита С (на основе положительного антитела [HCV At]) или вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1 или ВИЧ-2 на основе положительного антитела).

Наличие сопутствующих состояний, которые могут поставить под угрозу способность участника переносить исследуемое лечение или мешать любому аспекту проведения исследования или интерпретации результатов. Это включает, но не ограничивается этим, нестабильную или неконтролируемую стенокардию, застойную сердечную недостаточность класса III или IV Нью-Йоркской ассоциации сердца (NYHA), неконтролируемую и устойчивую гипертензию, клинически значимую сердечную дисритмию или клинически значимое отклонение ЭКГ (например, QTcF > 470 мс).

В течение последних 6 месяцев имело место любое из следующего: выпот в плевральной полости, инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, шунтирование коронарной/периферической артерии, острое нарушение мозгового кровообращения или транзиторная ишемическая атака.

Неконтролируемое судорожное расстройство (т.е. судороги в течение последних 2 месяцев).

Неспособен или не желает общаться или сотрудничать с исследователем или следовать протоколу по любой причине.

Исследуемое лечение: Доза ВР1001 и введение. ВР1001 поставляется в виде стерильного белого лиофилизированного порошка, не содержащего консервантов, для разведения для в/в введения и поставляется во флаконах по 20 мл. Каждый 20-мл флакон ВР1001 для разового использования содержит 5 мг олигонуклеотида Grb2 и 13,35 мг DOPC. Расчеты для дозирования основаны на олигонуклеотиде Grb2. Каждый флакон ВР1001 должен быть разведен в 2 мл физиологического раствора (0,9% хлорида натрия) для инъекций, чтобы получить концентрацию ВР1001 5,0 мг/2,0 мл (2,5 мг/мл). Восстановленный ВР1001 стабилен в течение приблизительно 6 часов после восстановления; следовательно, в/в инфузия должна быть завершена не дольше, чем приблизительно через 6 часов после восстановления.

В исследовании фазы Ib доза ВР1001, которая будет использоваться, составляет 60 мг/м<sup>2</sup> (группа 1) или 90 мг/м<sup>2</sup> (группа 2). ВР1001 будет вводиться в виде в/в инфузии в дни 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 (с допустимым интервалом +/-1 день) каждого 28-дневного цикла. Для цикла лечения 1 участники должны получить обе дозы ВР1001 (для дней 1 и 4), чтобы перейти к дозированию Das и продолжить исследование. Участники, не получающие обе дозы ВР1001 до начала приема дозы Das, могут быть исключены из дозирующей части исследования и войти в часть последующего наблюдения исследования.

Количество дозы для ВР1001 будет основываться на исходном уровне (при скрининге) площади поверхности тела (BSA); однако дозы будут скорректированы для участников, которые испытывают изменение веса  $\geq 10\%$  от исходного уровня. Фактический вес будет использоваться для расчета BSA, за исключением участников весом более чем 100 кг; доза будет рассчитываться на основе 100 кг для этих субъектов.

В/в инфузия будет проводиться в течение примерно 1-3 часов и не должна применяться в виде в/в введения или в/в болюса. Инфузия будет осуществляться через выделенную центральную или периферическую в/в линию и не может быть сделано одновременно с другими лекарствами.

Исследуемое лечение: доза дазатиниба и введение. Дазатиниб (Das) следует вводить перорально, один раз в день, начиная примерно с 5-го дня каждого 28-дневного цикла. Дозирование Das может начинаться уже на 5-й день каждого цикла, если оно начато не менее, чем через 24 часа после завершения второй дозы ВР1001.

После начала лечения Das следует продолжать без перерыва. Доза Das, использованная в этом исследовании, составляет 140 мг (каждая доза).

Сопутствующие препараты. В течение первых 4 недель терапии гидроксимочевина будет разрешена. Анагрелид также будет разрешен в любое время чтобы управлять тромбоцитозом >500K. Следующие лекарства не разрешены в течение периода лечения: любые противораковые средства (кроме Das, гидроксимочевины или анагрелида) для лечения изучаемого заболевания или других злокачественных новообразований.

Расписание и описание процедур. Участники будут проходить процедуры скрининга, как показано в табл. 10.

Таблица 10. Расписание событий и оценок

СОБЫТИЕ/ОЦЕНКА	Период лечения									
	-14 до -1	1	4	8	11	15	18	22	25	28/ВОТ
Толерантность (в днях)	0	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	±1
Информированное согласие	X									
Демография	X									
История болезни	X	X <sup>a</sup>								
Физическое обследование (PE)	X <sup>b</sup>					X <sup>c,d</sup>				X <sup>c</sup>
Общее состояние ECOG	X									
Рост, вес и BSA	X									X <sup>e</sup>
Жизненно важные признаки	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ЭКГ (не менее 12 отведений)	X									X
Рентгенограмма грудной клетки	X									
Серология для ВГВ, ВГС, ВИЧ	X									
СВС (с разн., вкл. бласт %)	X	X <sup>f</sup>		X <sup>d</sup>		X		X <sup>d</sup>		X <sup>g</sup>
Профиль коагуляции	X									X <sup>d</sup>
Биохимический анализ крови	X	X <sup>f</sup>		X <sup>d</sup>		X		X <sup>d</sup>		X
Анализ мочи	X					X <sup>d</sup>				X
Оценка костного мозга	X									X <sup>h</sup>
Тест на беременность (сыворотка) <sup>f, i</sup>	X									
Тест на беременность (моча) <sup>f, i</sup>		X								
Подтверждение критерия приемлемости	X	X <sup>d,f</sup>								
Введение ВР1001 <sup>j</sup>		X	X	X	X	X	X	X	X	
Введение Das <sup>k</sup>				X						
ФК ВР1001 плазмы <sup>l</sup>		X <sup>d,f</sup>			X <sup>d,f</sup>					
Запись сопутствующих лекарств	X									X
Запись нежелательного явления	X									X

- a - обновленный, основанный на истории, данный в SCR,  
b - физическое обследование должно включать полный обзор симптомов и полное обследование,  
c - только ориентированное на симптомы краткое PE,  
d - только цикл 1; Образцы будут собираться до введения дозы (в течение 30 минут до введения дозы), а затем через 1, 2, 4, 6, 8 и 24 часа после введения дозы. Образцы после введения дозы могут быть взяты +/- 15 минут их указанного времени,  
e - только вес,  
f - пробы крови должны быть взяты до начала приема любого исследуемого препарата или препарата Das,  
g - гематологический ответ оценивается в конце каждого цикла,  
h - оценка костного мозга, включая цитогенетические и молекулярные ответы, будет выполнена в конце циклов 1, 2, 4, 6 и даже циклов после этого,  
i - только женщины с детородным потенциалом,  
j - ВР1001 вводится внутривенно (в/в) инфузией два раза в неделю (каждые 2-4 дня) с интервалом ±1 день,  
k - Das вводится без перерыва; перорально 1 раз в день, не менее 24 часов после завершения приема второй дозы ВР1001,  
l - множественные оценки ФК. Образцы должны быть собраны в следующие моменты времени: до введения, через 1, 2, 4, 6, 8 и 24 часа после введения дозы. Образцы после введения дозы могут составлять ±15 мин.

Первоначальный визит наблюдения должен проводиться в течение 30 дней (+/-7 дней) после прекращения циклов лечения. Первоначальный визит наблюдения будет включать: Физическое обследование; СВС с дифференциалом и тромбоцитами, включая бласты %; биохимический анализ крови; Запись сопутствующих лекарств; Запись нежелательных явлений.

Долгосрочные визиты наблюдения должны проводиться каждые 8 недель (+/-1 неделя) с 30-дневного визита наблюдения, до 12 месяцев с начала терапии или до закрытия исследования или начала другой терапии или смерти.

Конечные точки эффективности. Предварительная эффективность будет оцениваться путем оценки ремиссии и объективного ответа с использованием следующих критериев ответа и измерений. Дополнительные конечные точки эффективности будут включать время до ответа, продолжительность ответа и общую выживаемость.

Критерии гематологического ответа (HR) представлены в табл. 11. Подтвержденный HR получается, когда все критерии выполнены по крайней мере через 28 дней после их первого выполнения.

Таблица 11. Критерии гематологического ответа

Ответ	Критерии
Основной ответ	Лейкоциты периферической крови $\leq$ институциональный верхний предел нормы (ULN - upper limit of norm)
	Тромбоциты $< 450000 \times 10^9/\text{л}$
	Нет бластов или промиелоцитов в периферической крови
	$< 5\%$ миелоцитов плюс метамиелоциты в периферической крови
	Базофилы периферической крови $< 20\%$
	Отсутствие экстрамедуллярного вовлечения, включая спленомегалию или гепатомегалию
	$< 5\%$ бластов в костном мозге
Частичный	Лейкоциты периферической крови $\leq$
ответ	институциональный ULN
	Тромбоциты $> 450000 \times 10^9/\text{л}$ , но $< 50\%$ до терапевтического уровня
	Нет бластов или промиелоцитов в периферической крови
	$> 5\%$ миелоцитов и метамиелоцитов в периферической крови
	Базофилы периферической крови $< 20\%$
	Спленомегалия или гепатомегалия, если они присутствуют, должны быть $< 50\%$ до терапевтического уровня
Прогрессирующее заболевание	Продвижение фазы акселерации пациента к бластной фазе
	Для пациентов с бластной фазой, удвоение количества периферических лейкоцитов по меньшей мере в два раза в течение 28 дней до $> 20000/\text{л.}\mu$
	Для любого пациента смерть от болезни
Стабильное заболевание	Пациент не соответствует критериям гематологического ответа или прогрессирующего заболевания

Цитогенетический ответ классифицируется в соответствии с подавлением филадельфийской хромосомы (Ph) цитогенетикой (или FISH, если цитогенетический анализ не информативен, например, недостаточно метафаз), как показано в табл. 12. Основным цитогенетическим ответом представляет собой комбинацию полного и частичного ответа.

Таблица 12. Цитогенетические критерии ответа

Ответ	Критерии
Нет цитогенетического ответа	Ph положительный > 95%
Незначительный цитогенетический ответ	Ph положительный 36-65%
Частичный цитогенетический ответ	Ph положительный 1-35%
Полный цитогенетический ответ	Ph положительный 0%

Молекулярный ответ классифицируется в соответствии с критериями, приведенными в табл. 13.

Таблица 13. Критерии молекулярного ответа

Ответ	Критерии
Основной	Соотношение BCR-ABL/ABL $\leq$ 0,1% (Международная шкала - IS-)
MR4	BCR-ABL/ABL < 0,01% IS
MR4.5	BCR-ABL/ABL < 0,0032% IS

Отчет о безопасности: Нежелательные явления (НЯ). Каждый участник, который получает исследуемый препарат, будет тщательно контролироваться на предмет наличия НЯ. НЯ - это любое неблагоприятное медицинское явление, связанное с употреблением лекарственных препаратов у людей, независимо от того, считается ли оно связанным с лекарственным препаратом. Нежелательные явления включают любые признаки, симптомы, заболевания или диагнозы, которые появляются или ухудшаются в ходе исследования. НЯ может быть интеркуррентным заболеванием, травмой или любым сопутствующим ухудшением здоровья участника. Все НЯ, возникающие в любое время с момента получения согласия и до окончания лечения, будут регистрироваться независимо от этиологии события. CTCAE NCI v4.03 будет использоваться для оценки НЯ. CTCAE можно найти в Интернете по адресу [evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf).

Нежелательные явления классифицируются как "серьезные" и "несерьезные" для целей нормативной отчетности. Обратите внимание, что определение "серьезный" не обязательно зависит от серьезности события. Все НЯ, которые не соответствуют критериям серьезности, считаются несерьезными.

Любое НЯ, возникающее в любой дозе (включая передозировку), независимо от отношения к исследуемому лекарственному препарату, будет классифицировано как серьезное нежелательное явление (СНЯ), когда (1) оно приводит к смерти (т.е. НЯ вызвало или привело к летальному исходу, участник имел риск смерти во время явления; это не относится к явлению, которое гипотетически могло бы привести к смерти, если бы оно было более серьезным); (2) это было опасно для жизни (т.е. НЯ подвергало человека немедленному риску смерти, а не то, что НЯ могло гипотетически привести к смерти, если бы оно было более тяжелым); (3) требовалась госпитализация или длительная госпитализация сверх ожидаемой продолжительности пребывания (т.е. госпитализации для планового лечения и плановых медицинских/хирургических процедур не являются СНЯ по этому критерию); (4) потеря дееспособности (то есть, НЯ привело к существенному снижению способности участника выполнять повседневную деятельность); (5) это привело к врожденной аномалии или врожденному дефекту (т.е. неблагоприятная находка у ребенка или плода участника, подвергшегося воздействию исследуемого препарата до зачатия или во время беременности); или (6) это было важное с медицинской точки зрения состояние (т.е. НЯ не соответствует ни одному из вышеперечисленных серьезных критериев, но, основываясь на соответствующем медицинском заключении, могло поставить под угрозу участника или потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения 1 из перечисленных серьезных исходов этих критериев [т.е. интенсивное лечение в отделении неотложной помощи или дома при аллергическом бронхоспазме; дискразии крови или судороги, которые не приводят к госпитализации]).

Причинно-следственная связь с VP1001 IP или Das для всех НЯ будет оцениваться следующим образом: (1) определены связаны -НЯ, явно связанные с исследуемой схемой введения; (2) вероятно связаны -НЯ, для которых есть возможность причинно-следственной связи для исследуемой схемы; (3) возможно связанные - НЯ, для которых есть сопутствующие заболевания, лекарства или другие соображения, но для которых не исключено, что НЯ, возможно, было вызвано исследуемой схемой; или (4) не связаны-НЯ, которые считаются явно не причинно-связанными с исследуемой схемой, или для которых есть четкое альтернативное объяснение.

Неожиданным НЯ является любое НЯ, которое не идентифицируется по природе, серьезности или частоте как известное последствие либо VP1001, либо Das. "Неожиданный", используемый в этом определении, относится к НЯ, которое ранее не наблюдалось, а не с точки зрения такого опыта, который не ожидается от фармакологических свойств фармацевтического продукта.

В табл. 14 приведены наиболее часто встречающиеся НЯ для монотерапии VP1001, а также НЯ с

интенсивностью 3 степени или выше (на основе общих терминологических критериев для нежелательных явлений [CTCAE], Версия 4.0 Национального института рака [NCI]) в исследовании 2003-0578, представленный группой лечения, диагнозом заболевания при включении в исследование и классом системы органа (SOC)/предпочтительным термином (PT), как указано в Медицинском словаре для регулирующей деятельности (MedDRA, версия 18.0).

Таблица 14. Наиболее частые нежелательные явления ( $\geq 3$  степени) по группам лечения, заболевания, SOC и PT

Класс Системы Органа (События/ Пациенты) Предпочитаемый термин	Количество пациентов (N=39)										
	Монотерапия -BP1001 мг/м <sup>2</sup>						Комбинированная терапия- BP1001 мг/м <sup>2</sup> +LDAC		Диагноз при включении в исследовани е		
	5 (n=13 )	10 (n =6 )	20 (n =3 )	40 (n =3 )	60 (n =3 )	90 (n =4 )	60 (n=4)	90 (n=3 )	ОМЛ (n=30)	ХМ Л (n =5 )	МД С (n =4 )
Пациенты с НЯ (91/28)	10	4	1	3	1	4	3	2	23	4	1
<b>Нарушения метаболизма и обмена веществ (19/12)</b>	12	3	0	1	0	3	0	0	8	4	0
Гипокалиемия	1	1	0	1	0	1	0	0	3	1	0
Синдром лизиса опухоли	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
Ацидоз	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Гипокальцемиа	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Нарушение дыхания	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Гипогликемия	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Гипонатремия	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
<b>Расстройства крови и лимфатической системы (12/11)</b>	5	2	1	1	0	1	2	0	10	2	0
Лейкоцитоз	3	2	1	1	0	1	0	0	6	2	0
Гиповолемия	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

Фебрильная нейтропения	2	1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	1	0	3	0	0
<b>Инфекции и заражения (9/9)</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Пневмония	0	2	0	0	0	2	0	0	4	0	0
Сепсис	4	1	0	0	0	0			4	1	0
Двусторонняя легочная инфекция	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Инфекция	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>Респираторные, торакальные и расстройства средостения (7/7)</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Одышка	0	0	0	1	0	1	0	1	3	0	0
Гипоксия	1	1	0	0	0	0	2	0	4	0	0
Плевральные выпоты							1	0	1	0	0
Респираторный дистресс	1	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0
<b>Общие расстройства и состояния места введения (5/5)</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
Астения	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Полиорганная недостаточность	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Отек нижней конечности	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>Почечные и мочевые расстройства (4/4)</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
Острая почечная травма	3	0	0	1	0	0	0	0	3	1	0
<b>Сердечные расстройства (3/3)</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Сердечная недостаточность	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<b>Обследования (3/2)</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Количество тромбоцитов уменьшилось	1	0	0	0	0	1 <sup>a</sup>	0	0	2	0	0
<b>Сосудистые нарушения (2/2)</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Гипотония	2	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0
<b>Гепатобилиарные расстройства (2/2)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Печеночная недостаточность	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<b>Новообразования доброкачественные, злокачественные и неуточненные (включая кисты и полипы) (2/2)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Желудочно-кишечные расстройства</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Боль в животе	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>Психические расстройства</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Галлюцинации	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Расстройства опорно-двигательного аппарата и соединительной ткани</b>	<b>0</b>	<b></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Боль в спине	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Заболевания репродуктивной системы и молочной железы</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Боль в пенисе	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
<b>Глазные расстройства</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Катаракта	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Прогрессирование ОМЛ	10	4	1	3	3	2	1	1	19	5	2

В табл. 15 приведены подробные данные о частоте всего лечения монотерапией с нежелательными

явлениями ВР1001 в исследовании 2003-0578, представлены SOC/PT, заболеваемость и интенсивность (на основе NCI CTCAE).

Таблица 15. Нежелательные явления, оцененные как связанные с изучаемым лекарственным препаратом ВР1001

Класс Системы Органа (События/Пациенты) Предпочитаемый термин	ID пациента исследования	Доза - монотерапия ВР1001 мг/м <sup>2</sup>	Доза - комбинированная терапия ВР1001 мг/м <sup>2</sup> +LDAC	Класс	Токсичность, ограничивающая дозу (DLT)
<b>Расстройства крови и лимфатической системы (1/1)</b>					
Коагулопатия	1	5	NA	1	Нет
<b>Желудочно-кишечные расстройства (4/1)</b>					
Диарея	1	5	NA	1	Нет
Мукозит	1			2	Нет
Мукозит	1			4	Да <sup>a</sup>
Тошнота	1			2	Нет
<b>Общие расстройства и состояния места введения (4/1)</b>					
Отек (конечности)	1	5	NA	2	Нет
Лихорадка (гипертермия)	1			1	Нет
Полиорганная недостаточность	1			5	Нет
Боль	1			2	Нет
<b>Инфекции и заражения (1/1)</b>					
Креатинин крови увеличился	10	5	NA	2	Нет
<b>Нарушения метаболизма и обмена веществ (6/1)</b>					
Гиперкалиемия	1	5	NA	2	Нет
Гипокальцемия	1			2 <sup>b</sup>	Нет
Гипокальцемия	1			3 <sup>b</sup>	Нет
Гипокалиемия	1			5	NA
<b>Расстройства опорно-двигательного аппарата и соединительной ткани (1/1)</b>					
Боль в конечности	1	5	NA	2	Нет
<b>Психические расстройства (1/1)</b>					
Спутанность сознания	1	5	NA	1	Нет
Синдром ладонно-подошвенной эритродизестезии (кисти и стопы)	1	5	NA	3	Да <sup>a</sup>
Зуд	1			1	Нет

<sup>a</sup> - поскольку эти события были оценены как возможные связанные с изучаемым препаратом ВР1001 и были 3-й степени, они были оценены как DLT. Оба события произошли у пациента 001 при уровне дозы 5 мг/м<sup>2</sup> (группа 1). Согласно протоколу, группа была расширена до 6 оцениваемых пациентов. В это время все 6 пациентов были обследованы без повторения какого-либо из этих событий у любого пролеченного пациента,

<sup>b</sup> - два (2) случая этого события были зарегистрированы для этого пациента, на том же уровне класса.

Возможные риски и побочные эффекты. Дазатиниб (Das) и ВР1001 могут вызывать снижение количества клеток крови (эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов). Известные побочные эффекты Das включают лихорадку, кожную сыпь, головную боль, усталость, диарею, тошноту, одышку и мышечные боли. Основываясь на исследованиях на животных и человеке, ВР1001 может вызывать синдром "кисть-стопа", волдыри/язвы во рту и низкий уровень лейкоцитов в крови.

Все способы, описанные и заявленные в данном документе, могут быть сделаны и выполнены без чрезмерных экспериментов в свете данного описания. Хотя композиции и способы по данному изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления изобретения, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что к способам и на этапах или в последовательности этапов описанного способа могут применяться изменения, описанные в данном документе, не отступая от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут заменить агенты, описанные в данном документе, в то время как будут достигнуты такие же или аналогичные результаты. Все такие аналогичные заменители и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

### Ссылки

Следующие ссылки в той мере, в которой они предоставляют иллюстративные процедурные или иные подробности, дополняющие изложенные в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Ashizawa AT and Cortes J. Liposomal delivery of nucleic acid-based anticancer therapeutics: BP-100-1.01. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 12:1107-1120, 2015.

ACS Website. (2013, July 24). What are the key statistics about acute myeloid leukemia?, Updated February 7, 2014. Retrieved January 6, 2015, from American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-key-statistics>

Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 2006; 107(9), 3481-3485.

Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills FK, Wheatley K. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*, 2007; 109, 1114-1124.

Cheson BD, Jasperse DM, Simon R, Friedman MA. A critical appraisal of low-dose cytosine arabinoside in patients with acute non-lymphocytic leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 1986; 4(12), 1857-1864.

Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, Hu S, Narasimhan NI, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Druker BJ, Deininger MWN, Talpaz M. (2012) Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 367: 2075-2088.

Daley G, van Etten R, Baltimore D. (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247: 824-830.

Degos L, Castaigne S, Tilly H, Sigaux F, Daniel MT. Treatment of leukemia with low-dose ara-C: a study of 160 cases. *Semin Oncol*, 1985; 12(2 Suppl 3), 196-199.

de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300: 765-767.

Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. (2002) *Trends Mol Med* 8: S14-18.

Druker BJ. (2008) Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112: 4808-4817.

Epner D, Koeffler H. (1990) Molecular genetic advances in chronic myelogenous leukemia. *Ann Int Med* 1: 3-6.

Fath I, Schweighoffer F, Rey I, Multon MC, Boiziau J, Duchesne M, Tocque B. Cloning of a Grb2 isoform with apoptotic properties. (1994) *Science* 264: 971-974.

Fukushima T, Kawabata H, Sawaki T, Satoh T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Sakai T, Miki M, Fujita Y, Tanaka M, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Umehara H. Low-dose cytarabine plus aclarubicin for patients with previously untreated acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome ineligible for standard-dose cytarabine plus anthracycline. *Anticancer Res*, 2012; 32, 1347-1354.

Gay B, Suarez S, Caravatti G, Furet P, Meyer T, Schoepfer J. Selective Grb2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. *Int J Cancer* 83, 1999; 235-241.

Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36: 93-99.

Gutierrez-Puente Y, Tari AM, Stephens C, Rosenblum M, Guerra RT, Lopez-Berestein G. Safety, pharmacokinetics, and tissue distribution of liposomal P-ethoxy antisense oligonucleotides targeted to Bcl-2. (1999) *J Pharmacol Exp Ther* 291: 865-869.

Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. (1983) Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 239-242.

Heisterkamp N, Henster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale P, Groffen J. (1990) Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344: 251-253.

Kadia TM, Borthakur G, Ferrajoli A, et al. Phase II trial of cladribine and low-dose arac (LDAC) alternating with decitabine in older patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2013; 15, 5011.

Kloetzer W, Kurzrock R, Smith L, Talpaz M, Spiller M, Gutterman J, and Arlinghaus R. (1985) The human cellular abl gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. *Virology* 140: 230-238.

Konopka J, Watanabe S, Witte O. (1984) An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37: 1035-1042.

Lim S-J, Lopez-Berestein G, Hung M-C, Lupu R, Tari AM. Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene*, 2000; 19, 6271-6276.

Menzin J, Lang K, Earle CC, Kerney D, Mallick R. The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Arch Intern Med*, 2002; 162(14), 1597-1603.

Moloney WC, Rosenthal DS. Treatment of early acute nonlymphatic leukemia with low dose cytosine arabinoside. *Haematol Blood Transfus*, 1981; 26, 59-62.

Mufti GJ, Oscier DG, Hamblin TJ, Bell AJ. Low doses of cytarabine in the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1983; 309(26), 1653-1654.

Nowell P, Hungerford D. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.

Nowell P, Hungerford DA. (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25: 85-109.

Pendergast A, Quilliam L, Cripe L, Bassing C, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun K, Der C, Schlessinger J, Gishizky M. (1993) BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75: 175-185.

Puil L, Liu J, GishG, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci P, Arlinghaus R, Pawson T. (1994) Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13: 764-773.

Rowley JD. (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. (1985) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315: 550-554.

Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborowska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B. (1994) Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for Ras-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 179: 1855-1865.

Skorski T, Kanakaraj P, Ku D-H, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak M, Wen S-C, Zon G, Gewirtz A, Perussia B, Calabretta B. (1995) Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86: 726-736.

Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, de Klein A, Verma RS, Coleman M, Dosik H, Groffen J. (1985) Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 313: 1429-1433.

Tari Ashizawa A, Cortes J. (2015) Liposomal delivery of nucleic acid-based anticancer therapeutics: BP-100-1.01. *Expert Opin Drug Deliv* 12: 1107-1120.

Tari AM, Gutiérrez-Puente Y, Stephens C, et. al. Liposome-incorporated Grb2 antisense oligodeoxynucleotide increases the survival of mice bearing bcr-abl-positive leukemia xenografts. (2007) *Int J Oncol* 31: 1243-1250.

Tari AM, Lopez-Berestein G. Cellular uptake of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Invest Drugs*, 2001; 2, 1450-1453.

Tari AM, Lopez-Berestein G. (2001) GRB2: a pivotal protein in signal transduction. *Semin Oncol* 28: 142-147.

Tari AM, Stephens C, Rosenblum M, Lopez-Berestein G. Pharmacokinetics, tissue distribution, and safety of P-ethoxy oligonucleotides incorporated in liposomes. *J Liposome Res*, 1998; 8, 251-264.

Tari AM, Hung M-C, Li K, Lopez-Berestein G. Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells. *Oncogene*, 1999; 18, 1325-1332.

Tari AM, Arlinghaus R, Lopez-Berestein G. Inhibition of Grb2 and Crkl proteins results in growth inhibition of Philadelphia chromosome positive leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 235, 383-388.

Thall PF, Simon RM, Estey EH. (1995) Bayesian sequential monitoring designs for single-arm clinical trials with multiple outcomes. *Statistics in medicine* 14: 357-379.

Tilly H, Castaigne S, Bordessoule D, Casassus P, Le Prisé PY, Tertian G, Desablens B, Henry-Amar M, Degos L. Low-dose cytarabine versus intensive chemotherapy in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in the elderly. *J Clin Oncol*, 1990; 8(2), 272-279.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et. al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. (2009) *Blood* 114: 937-951.

Williams E, Dunican D, Green P et al, Selective inhibition of growth factor-stimulated mitogenesis by a cell-permeable Grb2-binding peptide. *J Biol Chem*, 1997; 272, 22349-22354.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества первой фармацевтической композиции, содержащей устойчивый к нуклеазам полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2 у пациента, и второй фармацевтической композиции, содержащей ингибитор тирозинкиназы Vcr-Abl, где ингибитор тирозинкиназы Vcr-Abl представляет собой дасатиниб или нилотиниб, где первую фармацевтическую композицию вводят до введения второй фармацевтической композиции.

2. Способ по п.1, в котором указанный полинуклеотид гибридизуется с сайтом инициации трансляции нуклеиновой кислоты Grb2.

3. Способ по п.1 или 2, в котором указанный полинуклеотид представляет собой олигонуклеотид, имеющий длину 8-50 оснований.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором указанный полинуклеотид имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором указанный полинуклеотид содержит Р-этокси связи остова.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором указанный полинуклеотид инкапсулирован в липосому.

7. Способ по п.1, в котором первая фармацевтическая композиция дополнительно содержит нейтральный липид.

8. Способ по п.1, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят системно.

9. Способ по п.1, в котором указанная первая фармацевтическая композиция предназначена для внутриартериального или внутривенного введения.

10. Способ по п.7, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят в дозировке от около 60 до около 90 мг/м<sup>2</sup>.
11. Способ по п.7, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят два-четыре раза в неделю.
12. Способ по п.1, в котором ингибитор тирозинкиназы Vcg-Abl представляет собой дазатиниб.
13. Способ по п.12, в котором дазатиниб вводят в дозировке около 140 мг.
14. Способ по п.12, в котором дазатиниб вводят один раз в день.
15. Способ по п.1, в котором указанную вторую фармацевтическую композицию вводят системно.
16. Способ по п.15, в котором указанную вторую фармацевтическую композицию вводят перорально, внутриаартериально или внутривенно.
17. Способ по п.1, в котором указанная первая фармацевтическая композиция вводится по меньшей один день до введения указанной второй фармацевтической композиции.
18. Способ по п.1, в котором указанная первая фармацевтическая композиция и указанная вторая фармацевтическая композиция вводятся различными путями.
19. Способ по п.1, в котором пациент является человеком.
20. Способ по п.1, в котором рак представляет собой колоректальный рак, нейробластому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак легкого, рак желудка, рак крови, рак кожи, рак яичка, рак предстательной железы, рак яичника, рак печени или рак пищевода, рак шейки матки, рак головы и шеи, немеланомный рак кожи или глиобластому.
21. Способ по п.1, в котором рак представляет собой рак крови.
22. Способ по п.21, в котором рак крови представляет собой хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС).
23. Способ по п.22, в котором ХМЛ является ХМЛ акселерационной фазы или ХМЛ бластной фазы.
24. Способ по п.22, в котором ХМЛ или ОМЛ представляет собой Vcg-Abl-положительный ХМЛ или Vcg-Abl-положительный ОМЛ.
25. Способ по п.24, в котором Vcg-Abl-положительный ХМЛ или Vcg-Abl-положительный ОМЛ являются положительными по мутации T315I Vcg-Abl.
26. Способ по п.22, в котором ХМЛ или ОМЛ представляют собой положительный по филадельфийской хромосоме ХМЛ или положительный по филадельфийской хромосоме ОМЛ.
27. Способ по п.1, в котором пациент ранее провалил лечение иматинибом.
28. Способ лечения рака или миелодиспластического синдрома (МДС) у пациента, нуждающегося в этом, включающие введение пациенту эффективного количества первой фармацевтической композиции, содержащей устойчивый к нуклеазам полинуклеотид, который гибридизуется с нуклеиновой кислотой Grb2, и второй фармацевтической композиции, содержащей аналог цитидина.
29. Способ по п.28, в котором указанный полинуклеотид гибридизуется с сайтом инициации трансляции нуклеиновой кислоты Grb2.
30. Способ по п.28 или 29, в котором указанный полинуклеотид представляет собой олигонуклеотид, имеющий длину 8-50 оснований.
31. Способ по любому из пп.28-30, в котором указанный полинуклеотид имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1.
32. Способ по любому из пп.28-31, в котором указанный полинуклеотид содержит Р-этокси связи остова.
33. Способ по любому из пп. 28-32, в котором указанный полинуклеотид инкапсулирован в липосому.
34. Способ по п.28, в котором указанная первая фармацевтическая композиция дополнительно содержит нейтральный липид.
35. Способ по п.28, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят системно.
36. Способ по п.28, в котором указанная первая фармацевтическая композиция предназначена для внутриаартериального или внутривенного введения.
37. Способ по п.34, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят в дозировке от около 60 до около 90 мг/м<sup>2</sup>.
38. Способ по п.34, в котором указанную первую фармацевтическую композицию вводят два-четыре раза в неделю.
39. Способ по п.1, в котором аналог цитидина представляет собой децитабин, цитарабин или азациитидин.
40. Способ по п.39, в котором аналог цитидина представляет собой децитабин.
41. Способ по п.39, в котором аналог цитидина представляет собой цитарабин.
42. Способ по п.41, в котором цитарабин вводят в дозировке около 20 мг.
43. Способ по п.41, в котором цитарабин вводят два раза в день.
44. Способ по п.41, в котором цитарабин вводят подкожно.
45. Способ по п.28, в котором указанная первая фармацевтическая композиция вводится до введения указанной второй фармацевтической композиции.

46. Способ по п.28, в котором указанная первая фармацевтическая композиция и указанная вторая фармацевтическая композиция вводятся одновременно.

47. Способ по п.28, в котором указанную вторую фармацевтическую композицию вводят до введения указанной первой фармацевтической композиции.

48. Способ по п.28, в котором указанная первая фармацевтическая композиция и указанная вторая фармацевтическая композиция вводятся различными путями.

49. Способ по п.28, в котором пациент является человеком.

50. Способ по п.28, в котором рак представляет собой колоректальный рак, нейробластому, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, рак легкого, рак желудка, рак крови, рак кожи, рак яичка, рак предстательной железы, рак яичника, рак печени или рак пищевода, рак шейки матки, рак головы и шеи, немеланомный рак кожи или глиобластому.

51. Способ по п.50, в котором рак представляет собой рак крови.

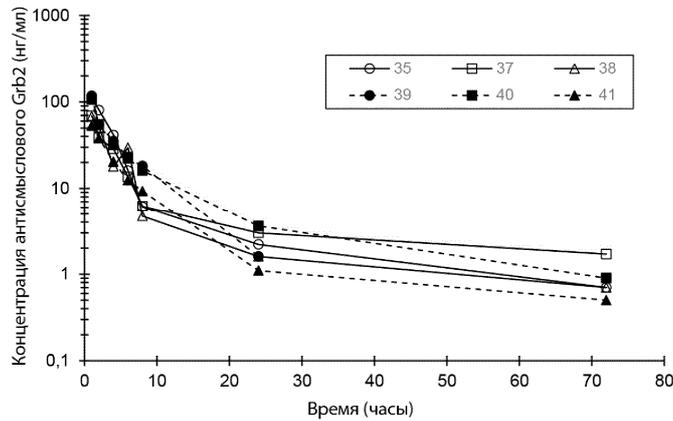
52. Способ по п.51, в котором рак крови представляет собой хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) или миелодиспластический синдром (МДС).

53. Способ по п.52, в котором ХМЛ является ХМЛ акселерационной фазы или ХМЛ бластной фазы.

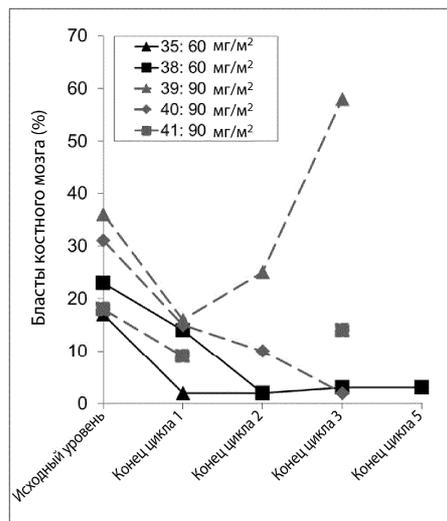
54. Способ по п.52, в котором ХМЛ или ОМЛ представляет собой Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ.

55. Способ по п.54, в котором Vcr-Abl-положительный ХМЛ или Vcr-Abl-положительный ОМЛ являются положительными по мутации T315I Vcr-Abl.

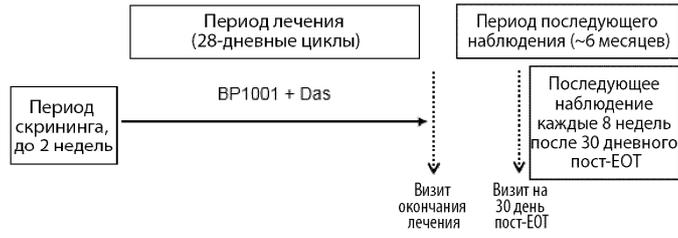
56. Способ по п.52, в котором ХМЛ или ОМЛ представляют собой положительный по филадельфийской хромосоме ХМЛ или положительный по филадельфийской хромосоме ОМЛ.



Фиг. 1

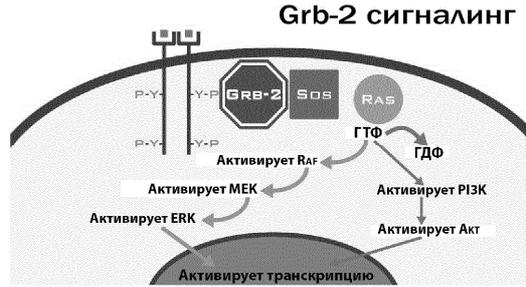


Фиг. 2

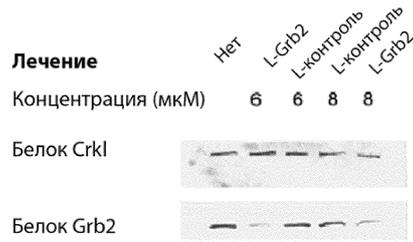


BP1001 дается в дни 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 и 25 (+/- 1 день)  
 Das дается на примерно 5 дней (+/- 1 день) и будет продолжаться без перерыва

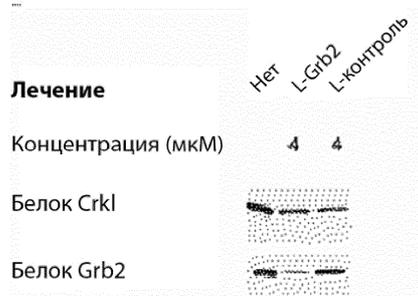
Фиг. 3



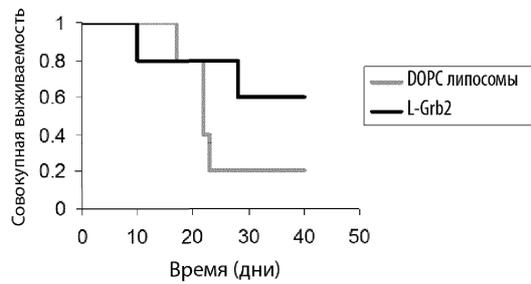
Фиг. 4



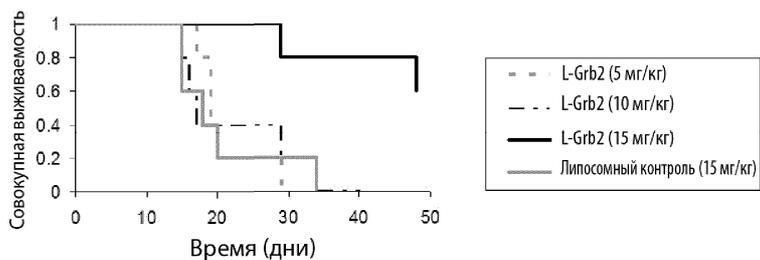
Фиг. 5А



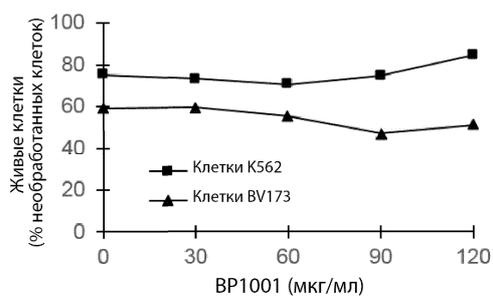
Фиг. 5В



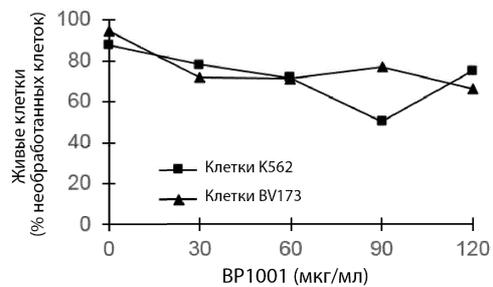
Фиг. 6А



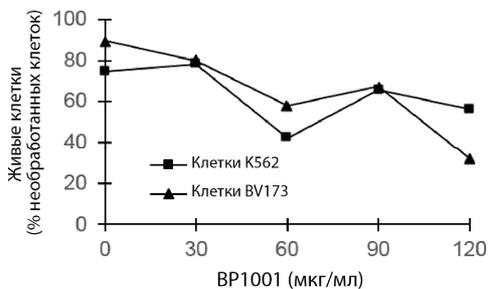
Фиг. 6В



Фиг. 7А

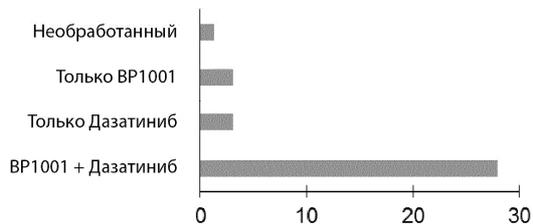


Фиг. 7В

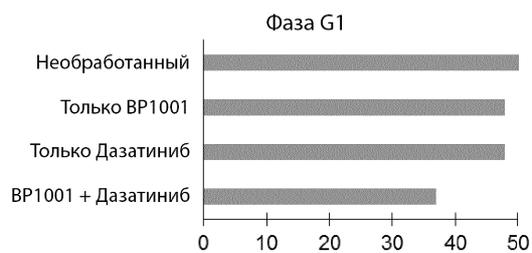


Фиг. 7С

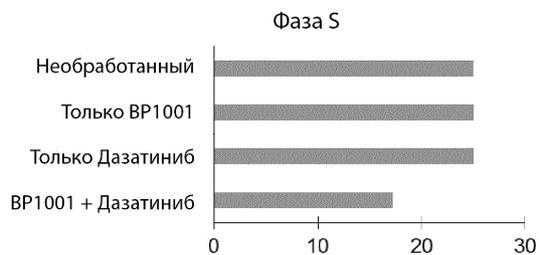
Суб G1



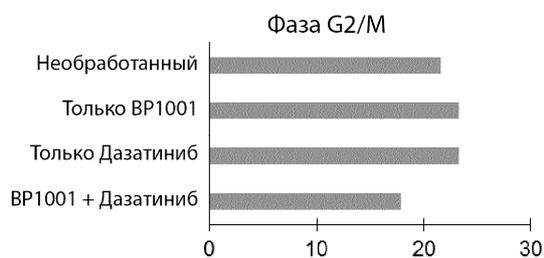
Фиг. 8А



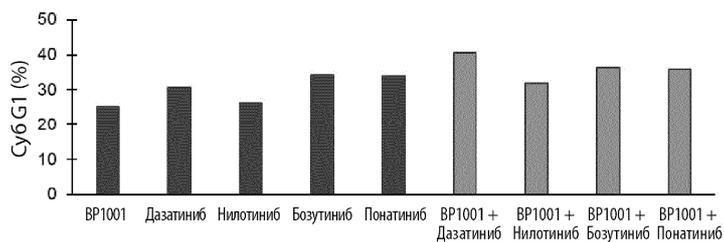
Фиг. 8B



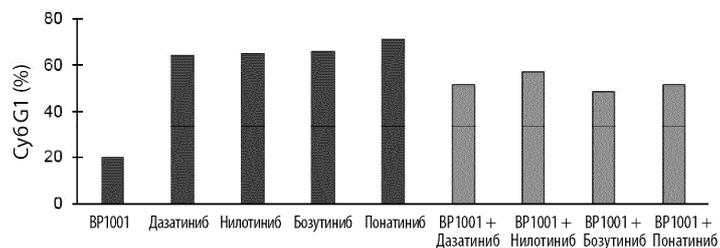
Фиг. 8C



Фиг. 8D



Фиг. 9A



Фиг. 9B

