

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290051 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.08.09

(22) Дата подачи заявки  
2020.06.19

(51) Int. Cl. A61K 31/437 (2006.01)  
A61K 31/706 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
A61K 31/404 (2006.01)  
A61L 2/00 (2006.01)  
A61L 2/16 (2006.01)  
A61K 31/513 (2006.01)

(54) АЗАЦИТИДИН В КОМБИНАЦИИ С ВЕНЕТОКЛАКСОМ, ГИЛТЕРИТИНИБОМ, МИДОСТАУРИНОМ И ДРУГИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЗА ИЛИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

(31) 62/864,413

(32) 2019.06.20

(33) US

(86) PCT/US2020/038772

(87) WO 2020/257671 2020.12.24

(71) Заявитель:  
СЕЛДЖЕН КВОНТИСЕЛ РИСЁРЧ,  
ИНК. (US)

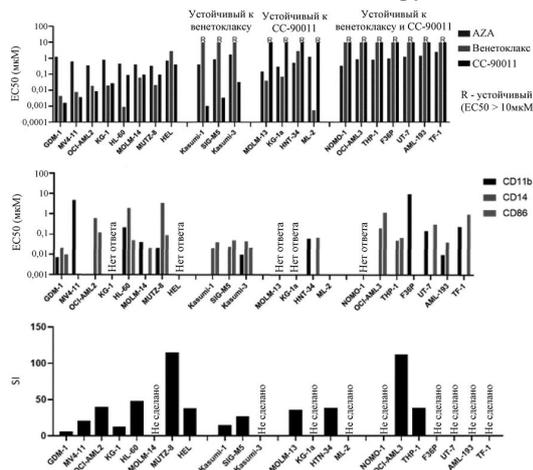
(72) Изобретатель:

Бич Кл, Роуз Шелонитда, Данши  
Диана Р., Лопес Де Менезес Дэниэл Э.,  
Макбет Кайл, Дай Юйминь, Джэнг  
Джессика, Фраттини Марк (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,  
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.,  
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,  
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) В изобретении представлены способы применения 5-азациитидина в комбинации с дополнительными средствами для лечения заболеваний и нарушений, включая в себя AML.



A1

202290051

202290051

A1

**АЗАЦИТИДИН В КОМБИНАЦИИ С ВЕНЕТОКЛАКСОМ, ГИЛТЕРИТИНИБОМ,  
МИДОСТАУРИНОМ И ДРУГИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЗА  
ИЛИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

**Описание**

**Родственные заявки**

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США 62/864413, поданной 20 июня 2019 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

**Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

[0002] Представлены способы применения 5-азацитидина в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами для лечения заболеваний и нарушений, которые включают в себя острый миелоидный лейкоз (AML).

**Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0003] Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой тип рака, который поражает костный мозг и кровь. AML известен под разными названиями, включая в себя острый миелогенный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз и острый нелимфоцитарный лейкоз. Слово «острый» в остром миелогенном лейкозе отражает быстрое прогрессирование заболевания. Его называют миелогенным лейкозом, потому что он поражает группу лейкоцитов, называемых миелоидными клетками, которые обычно развиваются в различные типы зрелых клеток крови, такие как эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Другими словами, AML представляет собой злокачественное новообразование линии миелоидных клеток-предшественников, характеризующееся быстрой пролиферацией аномальных клеток, которые накапливаются в костном мозге и мешают производству нормальных клеток.

[0004] AML, как правило, классифицируют как de novo или вторичный, когда он возникает после воздействия предшествующей цитотоксической химиотерапии или после предшествующего миелодиспластического синдрома (MDS), или предшествующего гематологического заболевания (АНД). Патогенез AML на генетическом уровне также неоднороден. Генетические изменения при AML включают в себя внутреннюю тандемную дупликацию в гене тирозинкиназы, хромосомные перестройки, которые изменяют функционирование генов, участвующих в лейкемогенезе, и мутации, приводящие к

активации факторов транскрипции и т.д. Всестороннее профилирование генетических изменений при AML улучшит классификацию заболеваний, стратификации риска и прогноза и, в конечном счете, позволит проводить более точные терапевтические вмешательства. MV4-11 и MOLM-13 представляют собой клеточные линии AML, которые экспрессируют мутации FLT3. Смотрите Quentmeier et al., *Leukemia*, 17(1):120-4 (Jan. 2003). FLT3-ITD активирует MCL-1, способствуя выживанию стволовых клеток при AML. Смотрите Yoshimoto et al., *Blood*, 114(24):5034-43 (Dec. 3, 2009).

**[0005]** Текущие стратегии лечения AML включают в себя индукционную химиотерапию (IC) для индукции ремиссии и низкоинтенсивную терапию, предназначенную для продления выживаемости. Химиотерапия, индуцирующая ремиссию, представляет собой циторедуктивный способ для достижения ремиссии или, по меньшей мере, эффективного уменьшения опухолевой массы. Комбинация цитарабина и антрациклина была основой лечения для достижения ремиссии. Обычная схема индукции состоит из цитарабина в дозе от 100 до 200 мг/м<sup>2</sup>/день в течение 7 дней и даунорубицина в дозе от 45 до 90 мг/м<sup>2</sup>/день в течение 3 дней, часто называемой «протоколом 7 + 3». При достижении ремиссии для консолидации применяют дополнительные циклы химиотерапии или трансплантацию стволовых клеток от донора (аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток [HSCT]). Хотя IC стала стандартом для более молодых здоровых пациентов, она остается предметом дискуссий для пожилых и нездоровых пациентов. У пожилых пациентов, получивших IC, исходы менее благоприятны, в первую очередь из-за повышенного уровня смертности, связанной с лечением, и плохих прогностических факторов, что приводит к более низкой частоте ремиссий, наблюдаемых у пожилых людей. Варианты лечения для пациентов, признанных неподходящими или непригодными из-за возраста, общего состояния здоровья и сопутствующих заболеваний, или для тех, кто решил не получать IC, текущие варианты химиотерапии включают в себя низкие дозы цитарабина, 5-азациитидина или децитабина.

**[0006]** Хотя индукционная химиотерапия вызывает морфологически полные ремиссии (CR) около у 60-80% молодых взрослых и у 40-50% пожилых людей с впервые диагностированным AML, существует значительная популяция пациентов, у которых не будет достигнута CR (т.е. рефрактерные). Даже у тех, кто достигает CR после индукционного лечения, значительная часть в конечном итоге рецидивирует, что приводит только к 29% безрецидивной выживаемости через 3 года.

**[0007]** Таким образом, существует потребность в более эффективных способах лечения AML, и настоящее раскрытие направлено на удовлетворение этой потребности.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

**[0008]** В настоящем документе предусмотрены способы лечения заболеваний и нарушений, включая в себя AML, с использованием 5-азацитина в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством и ингибитором лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой соли.

**[0009]** Определенные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают, что дополнительное терапевтическое средство выбрано из гилтеритиниба, мидостаурина, квизартиниба, энаседениба, ивосидениба или венетоклакса.

**[0010]** Согласно одному аспекту представлен способ лечения субъекта-человека, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), причем указанный способ предусматривает введение субъекту комбинации (i) фармацевтической композиции, содержащей 5-азацитин, (ii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства и (iii) ингибитора лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой соли.

**[0011]** Согласно некоторым вариантам осуществления субъект не подходит для интенсивной индукционной химиотерапии.

**[0012]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно, причем 5-азацитин вводят первым.

**[0013]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство входят в состав единичной лекарственной формы. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство составляют в виде отдельных лекарственных форм.

**[0014]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно.

**[0015]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое

средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно.

**[0016]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе от около 75 мг/м<sup>2</sup> до около 100 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят подкожно или внутривенно ежедневно в течение первых семи дней 28-дневного цикла.

**[0017]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 550 мг или 600 мг перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 200 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 300 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят ежедневно в течение первых семи, четырнадцати или двадцати одного дня 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят субъекту-человеку один или два раза в день. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в форме капсулы или таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в форме таблетки без энтеросолюбильного покрытия.

**[0018]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят перорально в дозе около 200 мг в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят перорально в дозе около 300 мг в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят перорально в дозе около 200 мг в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят перорально в дозе около 300 мг в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

**[0019]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят (a) ежедневно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней; (b) ежедневно в течение 14 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней; (c) в течение 21 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней; (d) в течение 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней; (e) в течение 21

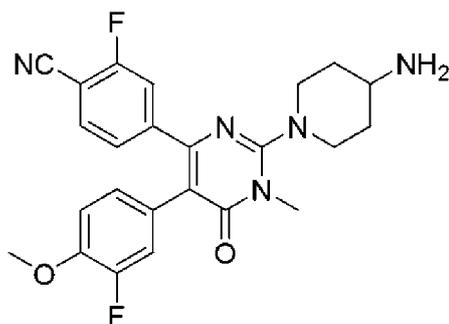
или более дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней; (f) в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одну из стадий (a), (b), (c), (d), (e) или (f) повторяют.

**[0020]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят (a) в дозе около 300 мг ежедневно в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней; (b) в дозе около 200 мг в день в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней; (c) в дозе около 300 мг ежедневно в течение 21 дня с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней; (d) в дозе около 200 мг в день с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одну из стадий (a), (b), (c) или (d) повторяют.

**[0021]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 7 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

**[0022]** Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство включает в себя гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и/или венетоклакс. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой венетоклакс. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят в форме таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят ежедневно. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят в дозе около 400 мг.

**[0023]** Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой соединение, характеризующееся структурой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

**[0024]** Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в форме таблетки или капсулы. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг.

**[0025]** Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению только одним 5-азациитидином. Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению по меньшей мере только одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению только одним ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью.

**[0026]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0027]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению по меньшей мере только с одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного

дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению по меньшей мере только с одним дополнительным терапевтическим средством около на 10 %, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0028]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0029]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0030]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством.

Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0031]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

**[0032]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) введение 5-азациитидина подкожно или внутривенно субъекту один раз в день в течение первых 7 дней 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[0033]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) введение 5-азациитидина подкожно или внутривенно субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

**[0034]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает: (a) введение 5-азациитидина в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла и/или (c) введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[0035]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает одновременное введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и дозе около 400 мг в дни с 4-28 28-дневного цикла.

**[0036]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение 5-азациитидина в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

**[0037]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) пероральное введение 5-азациитидина субъекту один раз в день в течение первых 14 дней 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[0038]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) пероральное введение 5-азациитидина субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

**[0039]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение 5-азациитидина в дозе около 300 мг каждый день в течение

первых четырнадцати дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[0040]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение 5-азацитина в дозе около 200 мг каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[0041]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает одновременное введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла.

**[0042]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение 5-азацитина в дозе около 300 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство включает в себя введение венетоклакса.

**[0043]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение 5-азацитина в дозе около 200 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-

дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство включает в себя введение венетоклакса.

**[0044]** Согласно некоторым вариантам осуществления острый миелоидный лейкоз включает в себя острый миелоидный лейкоз с рецидивирующими генетическими аномалиями, острый миелоидный лейкоз с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные новообразования, связанные с терапией, миелоидную саркому, миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна, бластное плазмацитоидное дендритное клеточное новообразование и/или острый промиелоцитарный лейкоз.

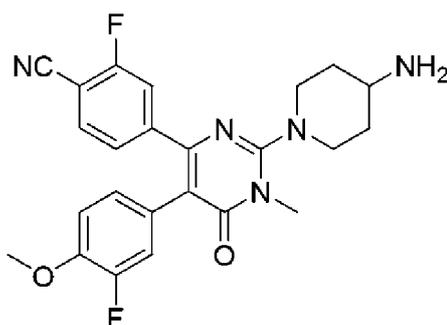
**[0045]** Согласно другому аспекту представлен способ лечения субъекта-человека, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), который не подходит для интенсивной индукционной химиотерапии, предусматривает введение субъекту-человеку:

(i) в первом непрерывном 28-дневном цикле:

(a) 5-азациитидин подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7;

(b) венетоклакс перорально в дозе около 100 мг в день 1; около 200 мг в день 2 и около 400 мг в день в дни с 3 по 28 и

(c) фармацевтическую композицию, содержащую безилатную соль следующего соединения:



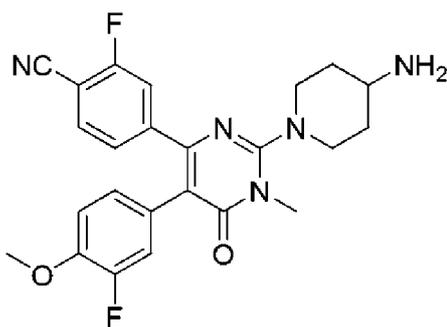
в дни 1, 8, 15 и 22; и

(ii) в последующие 28-дневные циклы:

(d) 5-азациитидин подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7 каждого последующего цикла;

(e) венетоклакс перорально в дозе около 400 мг в дни с 1 по 28 каждого последующего цикла и

(f) фармацевтическую композицию, содержащую безилатную соль следующего соединения



в дни 1, 8, 15 и 22 каждого последующего цикла.

**[0046]** Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в течение первого непрерывного 28-дневного цикла и последующих 28-дневных циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 60 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[0047]** Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах; и если доза 20 мг является переносимой, то открывается когорта второй дозы, в которой фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[0048]** Согласно некоторым вариантам осуществления, если доза 40 мг является переносимой, тогда открывается когорта третьей дозы, в которой фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[0049]** Как предшествующее краткое изложение, так и последующее описание графических материалов и подробное описание являются иллюстративными и пояснительными. Они предназначены для предоставления дополнительных деталей настоящего раскрытия, но не должны рассматриваться как ограничивающие. Другие цели, преимущества и новые признаки будут очевидны специалистам в настоящей области техники из следующего подробного описания настоящего раскрытия.

### **Краткое описание графических материалов**

**[0050]** На фиг. 1 показан максимальный кратный сдвиг  $EC_{50}$  для 5-азацитидина в комбинации с гилтеритинибом и 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином; оба с клеточными линиями MV4-11 и MOLM-13. Показаны результаты для трех различных схем введения доз: (i) 5-азацитидин, вводимый первым (черная полоса); (ii) одновременное введение двух средств (светло-серая полоса) и (iii) 5-азацитидин, вводимый вторым (средне-серая полоса).

**[0051]** На фиг. 2 представлены три различные схемы введения доз: (i) 5-азацитидин (AZA), вводимый первым с интервалами до введения ингибитора FLT3 (FLT3i); (ii) два средства (5-азацитидин и FLT3i), вводимые одновременно; и (iii) 5-азацитидин, вводимый вторым с интервалами после введения FLT3i. Ингибитором FLT3 может быть любой подходящий ингибитор FLT3, включая в себя мидостаурин или гилтеритиниб.

**[0052]** На фиг. 3A-D представлен максимальный кратный сдвиг  $EC_{50}$  5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом с клеточными линиями MV4-11 (фиг. 3A) и MOLM-13 (фиг. 3C). Показаны результаты трех различных схем введения доз, как указано в условных обозначениях: (i) 5-азацитидин, вводимый первым (черная полоса); (ii) одновременное введение двух средств (светло-серая полоса) и (iii) 5-азацитидин, вводимый вторым (средне-серая полоса). Также показан индекс синергизма для 5-азацитидина, вводимого в комбинации с венетоклаксом с клеточными линиями MV4-11 (фиг. 3B) и MOLM-13 (фиг. 3D) для трех различных схем введения доз.

**[0053]** На фиг. 4A-C показан анализ поверхности отклика, демонстрирующий синергетическое действие 5-азацитидина с венетоклаксом в клетках MV4-11, когда 5-азацитидин вводили первым (фиг. 4A), относительно более низкий синергизм при одновременном введении (фиг. 4B) и синергизм, когда венетоклаксом вводили первым (фиг. 4C). Методология поверхности отклика (RSM) — это хорошо известный статистический способ для изучения взаимосвязей между несколькими независимыми переменными и одной или несколькими переменными отклика. RSM использует последовательность спланированных экспериментов для получения оптимального отклика, который в данном случае представляет собой синергический эффект 5-азацитидина с венетоклаксом.

**[0054]** На фиг. 5 представлен вестерн-блоттинг, показывающий, что (a) 5-азацитидин и мидостаурин («aza + 0,3 мкМ Mido») и (b) 5-азацитидин и гилтеритиниб («aza + 0,3 мкМ Gilt») усиливают деградацию MCL-1 в клеточных линиях MV4-11.

**[0055]** На фиг. 6 представлен вестерн-блоттинг, показывающий, что обработка 5-азацитидином и венетоклаксом снижает уровни MCL-1 в клетках FLT3ITD MV4-11.

**[0056]** На фиг. 7A-C показаны оценки комбинаций 5-азацитидина *in vivo* в модели ксенотрансплантата MOLM-13 с графиком процентной выживаемости (ось Y) в

зависимости от дней с 0 по 70 (ось X). На фиг. 7А показаны результаты комбинации 5-азациитидина и мидостаурина, на фиг. 7В показаны результаты для 5-азациитидина в комбинации с венетоклаксом, а на фиг. 7С показаны результаты комбинации 5-азациитидина и гилтеритиниба. Дозированное введение для экспериментов, показанных на фиг. 7А-С было следующим: (i) 5-азациитидин (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность, LEED): 1 мг/кг внутривенно (IV), один раз в день в течение пяти дней, три раза (qd×5×3); (ii) 5-азациитидин (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность, HELD): 3 мг/кг внутривенно (IV), один раз в день в течение пяти дней (qd×5); (iii) мидостаурин (100 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)); (iv) гилтеритиниб (4 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)); и (v) венетоклак (100 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)). Р-значение (относительно лучшего отдельного средства) \*P < 0,05; \*\*P < 0,001; \*\*\*P < 0,0001.

**[0057]** На фиг. 8А, 8В и 8С показана чувствительность 22 клеточных линий АМЛ к 5-азациитидину (AZA) и венетоклаксу в качестве отдельных средств (фиг. 8А и 8В, соответственно) и комбинации с 5-азациитидином и венетоклаксом (фиг. 8С).

**[0058]** На фиг. 9А-Ф показана выживаемость клеток MV4-11 (фиг. 9А-С) и клеток MOLM-13 (фиг. 9D-F) через семь дней после начала лечения 5-азациитидином и венетоклаксом. Исследовали следующие схемы: введение 5-азациитидина в дни 1, 2 и 3 с последующим введением венетоклакса в день 4 (первый 5-азациитидин (AZA)) (фиг. 9А и 9D); совместное введение 5-азациитидина и венетоклакса в день 1 с последующим введением 5-азациитидина в дни 2 и 3 (одновременно) (фиг. 9В и 9Е); и введение венетоклакса в день 1 с последующим введением 5-азациитидина в дни 2, 3 и 4 (первый венетоклак) (фиг. 9С и 9F).

**[0059]** На фиг. 10А, 10В и 10С показана корреляция экспрессии MCL-1 со степенью синергетического эффекта комбинации 5-азациитидин-венетоклак в группе сконструированных клеточных линий BaF3, экспрессирующих FLT3 дикого типа, мутации FLT3-ITD или FLT3 (D835Y).

**[0060]** На фиг. 11 показана корреляция уровня РНК *MCL1*, измеренного с помощью RNASeq, с индексом синергизма ( $r^2 = -0,5607$ ,  $p = 0,0101$ ) на панели из 20 клеточных линий АМЛ.

**[0061]** На фиг. 12А-Н показана степень опосредованной 5-азациитидином деградации MCL-1 в четырех различных клеточных линиях АМЛ: KG1α (фиг. 12А), MV4-11 (фиг. 12В), ТНР-1 (фиг. 12С) и OCI-AML2 (фиг. 12D). Результаты показали синергетическую активность 5-азациитидина-венетоклакса с клеточными линиями KG1α (фиг. 12Е) и MV4-11

(фиг. 12F) (индекс синергизма (SI) 70 и 35,5, соответственно) и очень небольшую синергетическую активность или ее отсутствие с ТНР-1 (фиг. 12G) и клеточными линиями OCI-AML-2 (фиг. 12H) (SI 20,2 и 10,8, соответственно). Для клеточных линий KG1 $\alpha$  (фиг. 12A) и MV4-11 (фиг. 12B), где 5-азациитидин-венетоклак оказывал наибольший синергетический эффект (фиг. 12E и 12F), 5-азациитидин приводил к деградации MCL-1 быстрее всего, начиная с 6 часов после обработки. Напротив, для ТНР-1 (фиг. 12G), где 5-азациитидин-венетоклак обеспечивал лишь незначительную синергетическую активность, опосредованная 5-азациитидином деградация MCL-1 наблюдалась позже, начиная с 16 часов, с неполным расщеплением через 24 часа (фиг. 12C). Для OCI-AML2 (фиг. 12D), где 5-азациитидин-венетоклак характеризовался самым низким синергетическим эффектом (фиг. 12H), обработка 5-азациитидином не приводила к какой-либо деградации MCL-1.

**[0062]** На фиг. 13A показан вестерн-блоттинг, оценивающий деградацию каспазы 3. Клетки обрабатывали Z-VAD-FMK, ингибитором рап-каспазы, и измеряли степень деградации MCL-1 под действием 5-азациитидина. На фиг. 13B показана гистограмма деградации MCL-1 5-азациитидином, где клетки обрабатывали 20 мкМ Z-VAD-FMK в течение 1 часа перед обработкой 5-азациитидином в течение еще 16 часов. Ингибирование каспазы частично устраняло деградацию MCL-1 5-азациитидином в клетках MV4-11, что предполагает дополнительные, независимые от каспазы механизмы деградации MCL-1.

**[0063]** На фиг. 14A и B представлены результаты RNAseq, проведенного на клетках MV4-11, обработанных PBS (носитель), 5-азациитидином в концентрации 1 мкМ в течение 24 часов (фиг. 14A) или 5-азациитидином в концентрации 1 мкМ в течение 48 часов (фиг. 14B). На фиг. 14A и B показаны вулканные диаграммы значительно измененных генов через 24 часа (фиг. 14A) и 48 часов (фиг. 14B), показывающие, что 5-азациитидин индуцирует 133 дифференциально экспрессируемых гена через 24 часа и 226 дифференциально экспрессируемых генов через 48 часов. При дальнейшем анализе дифференциально экспрессируемых генов, индуцированных 5-азациитидином, были идентифицированы два гена, которые, как было показано ранее, регулируют экспрессию MCL1: активирующий транскрипционный фактор 3 (ATF3) и стеароил-КоА-десатураза (SCD). Экспрессия ATF3 увеличивалась в два раза через 48 часов после обработки 5-азациитидином. Экспрессия SCD (стеароил-КоА-десатураза), регулятора метаболизма липидов и MCL1, снижалась в 2,5 раза при воздействии 5-азациитидином через 48 часов. Изменения в экспрессии ATF3 (фиг. 14C) и SCD (фиг. 14D) были подтверждены в отдельном эксперименте с использованием ПЦР в реальном времени. Экспрессия ATF3 увеличивалась в зависимости от времени и концентрации, поскольку обработка 0,3 мкМ 5-азациитидином была недостаточной для индукции экспрессии ATF3 ни через 24, ни через 48 часов (фиг. 14C). Точно так же

экспрессия SCD быстро снижалась в течение 24 часов при обработке 3 мкМ 5-азациитидином, хотя в этот момент на нее не влияли низкие концентрации 5-азациитидина (фиг. 14D).

**[0064]** На фиг. 15A-C показаны результаты нокдауна siRNA генов ATF3 и/или SCD в клетках MV4-11 для оценки их синергической функции. Клетки MV4-11 оставляли нетрансфицированными или трансфицировали ATF3, SCD или контрольной (скремблированной) siRNA. В качестве контроля клетки трансфицировали siRNA и собирали для РНК и количественной ПЦР через 72 часа после трансфекции (фиг. 15A). В клетках, обработанных скремблированной siRNA, не наблюдалось изменений в экспрессии ATF3 (фиг. 15B) или SCD (фиг. 15C). После трансфекции клетки обрабатывали различными концентрациями 5-азациитидина ежедневно в течение 1-3 дней. На 4-й день в клетки вводили венетоклак с последующим тестом на жизнеспособность клеток с использованием CellTiter-Glo® 7 после начала лечения. Синергизм 5-азациитидина-венетоклакса рассчитывали с использованием анализа Combobenefit и Highest Single Agent (фиг. 15D-G). Фиг. 15D = нетрансфицированные клетки; фиг. 15E = скремблированная RNAi; фиг. 15F = нокдаун ATF3 и фиг. 15G = нокдаун SCD.

**[0065]** На фиг. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E и 16F представлены результаты оценки того, обладают ли 5-азациитидин и венетоклак синергической активностью *in vivo* в дозах и схемах, соответствующих инъекционному 5-азациитидину (HELD) или пероральному 5-азациитидину (LEED). MV4-11 (фиг. 16A-C) и MOLM-13 (фиг. 16D-F), две клеточные линии, демонстрирующие синергию 5-азациитидин-венетоклакса, должны были быть использованы для получения мышей с диссеминированным ксенотрансплантатом AML у животных с иммунодефицитом. *In vitro* венетоклак повышал чувствительность обеих клеточных линий к венетоклаксу (фиг. 16A и 16D) и проявлял синергизм с 5-азациитидином (фиг. 16B и 16E). Для моделирования пероральных схем приема 5-азациитидина (LEED) мышей лечили 5-азациитидином в дозе 1 мг/кг в течение 15 дней (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность). В качестве альтернативы, чтобы использовать ту же кумулятивную дозу, но с инъекционной схемой введения 5-азациитидина (HELD), мышей лечили 5-азациитидином в дозе 3 мг/кг в течение 5 дней (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность).

**[0066]** На фиг. 17A, 17B, 17C, 17D, 17E, 17F, 17G, 17H, 17I, 17J и 17K представлены результаты исследования того, оказывает ли совместное лечение 5-азациитидином и ингибиторами FLT3 синергический эффект на клетки AML. На фиг. 17A-D показаны результаты экспериментов с клетками MV4-11, а на фиг. 17E-H показаны результаты экспериментов с клетками MOLM-13. На фиг. 17A, 17B, 17E и 17F показаны результаты

обработки 5-азацитидином и мидостаурином. На фиг. 17C, 17D, 17G и 17H показаны результаты обработки 5-азацитидином и гилтеритинибом. Клетки обрабатывали ежедневными дозами 5-азацитидина в день 1-3, а затем обрабатывали ингибитором FLT-3 (мидостаурином или гилтеритинибом) в день 4. Клетки собирали в день 7, и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа CellTiter-Glo®. Мидостаурин повышал чувствительность MV4-11 к 5-азацитидину (фиг. 17A) и проявлял синергическую активность с 5-азацитидином (фиг. 17B). Подобные эффекты наблюдались в клетках MV4-11, обработанных 5-азацитидином и гилтеритинибом (фиг. 17C и 17D), а также в клетках MOLM-13, обработанных 5-азацитидином и мидостаурином (фиг. 17E и 17F) или гилтеритинибом (фиг. 17G и 17H). На фиг. 17I показаны результаты для клеток MOLM-13 по проценту выживаемости (ось Y) по сравнению с днями 1-70 для введения носителя, 5-азацитидина (LEED), 5-азацитидина (HELD), мидостаурина, 5-азацитидина (LEED) + мидостаурина и 5-азацитидина (HELD) + мидостаурина. На фиг. 17J показаны результаты процентной выживаемости клеток MV4-11 (ось Y) по сравнению с днем 1-91 для введения носителя, 5-азацитидина (LEED), 5-азацитидина (HELD), мидостаурина, 5-азацитидина (LEED) + мидостаурина и 5-азацитидина (HELD) + мидостаурина. На фиг. 17K показаны результаты процентной выживаемости клеток MOLM-13 (ось Y) по сравнению с днем 1-70 для введения носителя, 5-азацитидина (LEED), 5-азацитидина (HELD), гилтеритиниба, 5-азацитидина (LEED) + гилтеритиниба и 5-азацитидина (HELD) + гилтеритиниба.

**[0067]** На фиг. 18A-C показана оценка цитотоксичности различных средств. Эффективность CC-90011, AZA и венетоклакса в качестве монотерапии для индуцирования цитотоксичности оценивали на 22 клеточных линиях AML (фиг. 18A). На фиг. 18A показана цитотоксичность одного средства (EC50); на фиг. 18B показана индукция маркера дифференцировки с помощью CC-90011 (EC50) и на фиг. 18C показан индекс синергизма CC-90011/(AZA + Ven) (SI). Четыре клеточные линии были чувствительны к AZA и венетоклаксу, но устойчивы к CC-90011 ( $EC_{50} > 10$  мкМ), в то время как 7 клеточных линий были устойчивы как к венетоклаксу, так и к CC-90011 (фиг. 18A). Ингибиторы LSD усиливают дифференцировку в нескольких клеточных линиях AML и в моделях ксенотрансплантатов AML человека (фиг. 18B). Чтобы исследовать индукцию маркеров дифференцировки с помощью CC-90011, использовали проточную цитометрию для измерения экспрессии поверхностных маркеров CD11b, CD14 и CD86 в 22 клеточных линиях AML после обработки CC-90011. Семнадцать из этих клеточных линий увеличили экспрессию по меньшей мере одного из этих маркеров дифференцировки, в то время как пять клеточных линий не имели изменений ни в одном из этих маркеров дифференцировки, включая в себя HEL, KG-1, MOLM-13, KG-1a и NOMO-1. фиг. 18B). Чтобы проверить,

проявляет ли тройная комбинация AZA+Ven+CC-90011 синергизм в клеточных линиях AML, 13 из 22 клеточных линий AML обрабатывали различными концентрациями AZA+Ven+CC-90011 (фиг. 18C).

**[0068]** На фиг. 19А-М изображен анализ жизнеспособности клеток с использованием CellTiter-Glo® и расчет синергизма с использованием Combenefit и поверхности, нанесенной на карту с использованием моделирования «Наиболее эффективного отдельного средства». Фиг. 19А = клетки MB4-11; фиг. 19В = клетки OCI-AML2; фиг. 19С = клетки Molm-13; фиг. 19D = клетки KG1; фиг. 19Е = клетки HL-60; фиг. 19F = клетки Kasumi-1; фиг. 19G = клетки GDM-1; фиг. 19H = клетки THP-1; фиг. 19I = клетки MUTZ-8; фиг. 19J = клетки HNT-34; фиг. 19K = клетки OCI-AML3; фиг. 19L = клетки HEL и фиг. 19M = клетки SIG-M5.

**[0069]** На фиг. 20А-С показано сравнение различных комбинированных обработок. Чтобы выяснить, была ли тройная комбинация AZA+Ven+CC-90011 более эффективной по сравнению с AZA+CC-90011 или Ven+CC-90011, тройную комбинацию сравнивали с парными комбинациями этих средств (фиг. 20А-D). В OCI-AML-2 двойные комбинации AZA+CC-90011 (фиг. 20А), Ven+CC-90011 (фиг. 20В) или AZA+Ven (фиг. 20С) не проявляли синергизма в клетках OCI-AML2. Однако когда OCI-AML2 обрабатывают комбинацией AZA+Ven+CC-90011 (фиг. 20D), синергизм существенно увеличивается.

**[0070]** На фиг. 21 показан дизайн исследования примера 2.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

#### **I. Обзор**

**[0071]** Настоящее изобретение относится к способам лечения острого миелоидного лейкоза (AML) путем введения человеку (i) фармацевтической композиции, содержащей 5-азациитидин; и (ii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство включает в себя гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и/или венетоклакс. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с (i) фармацевтической композицией, содержащей 5-азациитидин; и (ii) по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие 5-азациитидин по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством и, необязательно, ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью, для лечения AML у человека.

**[0072]** Согласно другому аспекту описан способ лечения острого миелоидного лейкоза (AML) путем введения субъекту-человеку (i) фармацевтической композиции, содержащей 5-азациитидин; (ii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства и (iii) ингибитора лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство включает в себя гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и/или венетоклакс. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой венетоклакс. Также в настоящем документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие 5-азациитидин по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством и лизин-специфическим ингибитором деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой солью, для лечения AML у человека.

**[0073]** Согласно некоторым вариантам осуществления определенные комбинации работают синергетически при лечении конкретных заболеваний или нарушений, включая в себя, например, формы рака и определенные заболевания и состояния, связанные или характеризующиеся нежелательным ангиогенезом или аномальной клеточной пролиферацией.

**[0074]** Острый миелоидный лейкоз (AML), также известный как острый миелогенный лейкоз, представляет собой агрессивное гетерогенное миелоидное злокачественное новообразование. По данным Американского онкологического общества, AML является наиболее распространенным типом лейкоза, диагностируемым у взрослых, и составляет 32% всех случаев лейкоза у взрослых. По оценкам, приблизительно у 19940 человек будет диагностирован AML в 2020 году в Соединенных Штатах (США), при этом 11180 пациентов умрут от этого заболевания. Заболевание особенно трудно поддается лечению у пожилых людей, которые составляют большинство пациентов; таким образом, 5-летняя общая выживаемость составляет лишь приблизительно 29%. Национальный институт рака, SEER Cancer Stat Facts: Leukemia - Acute Myeloid Leukemia (AML), <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (по состоянию на 10 июня 2020 г.). С 1970-х годов начальная стандартная терапия для тех, кто достаточно здоров, чтобы ее получать, состояла из схемы «7+3», которая включает в себя 7 дней непрерывной инфузии цитарабина и 3 дня антрациклина. Rai *et. al. Blood* 1981:58: 1203-1212. В течение следующих 35 лет был проведен ряд клинических испытаний, направленных на усиление лечения AML с небольшими изменениями в стандарте лечения. Однако недавние данные, подробно описывающие молекулярный онтогенез AML, прояснили причинно-следственные связи,

которые привели к усилиям по разработке таргетной лекарственной терапии. E. Winer and R. Stone, *Ther. Adv. Hematol.*, 10:PMC6624910 (July 2019).

**[0075]** Существует давно ощущаемая потребность в комбинированных способах лечения, описанных в настоящем документе, поскольку АМЛ характеризуется высокой частотой рецидивов, а кроме того, рецидивирующий и рефрактерный АМЛ представляет собой очень тяжелое заболевание и, вероятно, обусловлено множественными аномальными сигнальными путями, которые дают лейкомической клетке преимущество в преодолении любого одиночного пути, который подавляется. Таким образом, успешные комбинированные способы лечения очень желательны в борьбе с АМЛ.

**[0076]** Согласно одному из аспектов описанных в настоящем документе способов лечения пациент, которого лечат, находится в возрасте около 60 лет или старше. Согласно другому аспекту описанных в настоящем документе способов лечения пациент, которого лечат, находится в возрасте около 65 лет или старше, около 70 лет или старше, около 75 лет или старше или около 80 лет или старше. Согласно еще одному аспекту пациент представляет собой субъекта с рецидивом АМЛ. Согласно другому аспекту пациент представляет собой субъекта с рефрактерным АМЛ. Подлежащий лечению субъект также может быть моложе около 60 лет, моложе около 55 лет, моложе около 50 лет, моложе около 45 лет или моложе около 40 лет. Согласно другим аспектам подлежащий лечению пациент имеет мутации FLT3, либо FLT3-ITD или FLT3-TKD. Согласно некоторым аспектам подлежащий лечению пациент имеет рецидивирующую мутацию АМЛ. Примеры мутаций АМЛ включают в себя, без ограничения, родственную Fms тирозинкиназу 3 (FLT3), гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен (KRAS), гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS (V-Ras) (NRAS), протоонкоген c-Kit (KIT), протеинтирозинфосфатазу нерцепторного типа 11 (PTPN11), нейрофибромин 1 (NF1), ДНК-метилтрансферазу 3A (DNMT3A), изоцитратдегидрогеназу 1 (IDH1), изоцитратдегидрогеназу 2 (IDH2), транслокацию ten-eleven-2 (TET2), additional sex comb-like 1 (ASXL1), энхансер гомолога zeste 2 (EZH2), лейкоз смешанного происхождения 1/гистон-лизин N-метилтрансфераза 2A (MLL/KMT2A), нуклеофосмин (NPM1), связывающий энхансер ССААТ белок альфа (CEBPA), родственный runt фактор транскрипции 1 (RUNX1), GATA-связывающий фактор 2 (GATA2), опухолевый белок p53 (TP53), богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 2 (SRSF2), вспомогательный фактор 1 малой ядерной РНК U2 (U2AF1), субъединица 1 фактора сплайсинга 3b (SF3B1), цинковый палец (тип CCCH), РНК-связывающий мотив и богатый серином/аргинином 2 (ZRSR2), RAD21 компонент комплекса когезина (RAD21), стромальный антиген 1 (STAG1), стромальный антиген 2

(STAG2), структурное поддержание хромосом 1A (SMC1A) и структурное поддержание хромосомного белка 3 (SMC3).

## II. Экспериментальные протоколы

**[0077]** Исследуемые комбинации лекарственных средств включают в себя 5-азациитидин, назначаемый в комбинации с ивосиденибом, энасиденибом, венетоклаксом или ингибитором FLT3 (у субъектов с AML с мутацией FLT3 ITD или TKD). Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в комбинации с венетоклаксом.

**[0078]** Изоцитратдегидрогеназа (IDH) является критическим ферментом в цикле лимонной кислоты. Мутированные формы IDH производят высокие уровни (R)-энантиомера 2-гидроксиглутарата (R-2-HG) и могут способствовать росту опухолей. IDH1 катализирует эту реакцию в цитоплазме, тогда как IDH2 катализирует эту реакцию в митохондриях. Ивосидениб и энасидениб являются ингибиторами IDH.

**[0079]** Ивосидениб (Tibsovo®) представляет собой низкомолекулярный ингибитор IDH1. В опухолях пациентов с диагнозом глиома, острый миелоидный лейкоз (AML), холангиокарцинома и хондросаркома наблюдаются соматические мутации в консервативном активном центре изоцитратдегидрогеназы (IDH) 1 и 2. С этими новыми мутациями эти ферменты проявляют новое, неоморфное поведение, которое приводит к восстановлению  $\alpha$ -кетоглутарата до онкометаболита R-2-гидроксиглутарата. Ивосидениб конкурентно ингибирует ферменты, зависящие от  $\alpha$ -кетоглутарата, что в конечном итоге приводит к эпигенетическим изменениям и нарушению гемопоэтической дифференцировки.

**[0080]** В исследованиях *in vitro* ивосидениб продемонстрировал неконкурентное ингибирующее поведение в отношении субстрата альфа-кетоглутарата ( $\alpha$ -KG) и кофактора НАДФН. Это то, что, как полагают, приводит к тому, что ивосидениб является быстрым равновесным ингибитором гомодимера mIDH1-R132H.

**[0081]** Энасидениб (Idhifa®) представляет собой низкомолекулярный ингибитор гена изоцитратдегидрогеназы 2 (IDH2). Как отмечалось выше, мутантные формы IDH производят высокие уровни R-2-HG, при этом IDH1 катализирует эту реакцию в цитоплазме, а IDH2 катализирует эту реакцию в митохондриях. Энасидениб нарушает этот цикл, снижая общий уровень (R)-2-HG в митохондриях.

**[0082]** Венетоклакс (Venclexta® и Venclyxto®) представляет собой миметик ВНЗ (домен 3 гомологии Bcl-2), поскольку он блокирует белок антиапоптотической В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2), что приводит к запрограммированной гибели клеток хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL). Иногда показано, что избыточная

экспрессия Vcl-2 при некоторых лимфоидных злокачественных новообразованиях связана с повышенной резистентностью к химиотерапии.

**[0083]** Ингибиторы FLT3 представляют собой ингибиторы тирозинкиназы (TKI). Как и другие ингибиторы тирозинкиназы, они конкурируют за сайт связывания аденозинтрифосфата (АТФ) в активном домене киназы, что подавляет способность белка к фосфорилированию и впоследствии снижает активность этого белка. Мутации FLT3 являются одной из наиболее частых находок при остром миелоидном лейкозе (AML). Ген FLT3/ITD обнаруживается приблизительно у 30% больных AML с нормальной цитогенетикой. Ген FLT3 экспрессируется в основном в гемопоэтических предшественниках и дендритных клетках человека и играет ключевую роль в пролиферации, дифференцировке и выживании лейкозных клеток. Конститутивная активация гена FLT3/ITD запускает несколько нижестоящих сигнальных каскадов, таких как пути STAT5, RAS, MEK и PI3K/AKT, и в конечном итоге вызывает подавление апоптоза и дифференцировки лейкозных клеток, включая в себя нарушение регуляции пролиферации лейкозных клеток. Оцениваемые ингибиторы FLT3 включают в себя мидостаурин (Rydapt<sup>®</sup>) и гилтеритиниб (Xospata<sup>®</sup>). Мидостаурин представляет собой полусинтетическое производное стауроспорина, алкалоида бактерии *Streptomyces staurosporeus*, и активен в отношении онкогенного CD135 (FMS-подобного тирозинкиназного рецептора 3, FLT3). Гилтеритиниб также действует как ингибитор тирозинкиназы рецептора AXL.

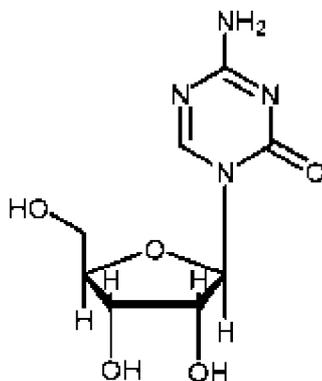
**[0084]** Пример 2 описывает эксперимент, в котором оценивают безопасность и переносимость СС-90011, безилатной соли 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрила в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином у ранее не получавших лечения субъектов с AML, которым не показана интенсивная индукционная химиотерапия. СС-90011 представляет собой ингибитор лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1). На фиг. 21 показан общий дизайн исследования для примера 2.

**[0085]** Целями эксперимента будут (1) оценка безопасности и переносимости СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином у ранее не получавших лечения субъектов с AML, которые не подходят для интенсивной индукции; (2) оценка предварительной эффективности СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином у ранее не получавших лечения субъектов с AML, которым не показана интенсивная индукционная химиотерапия; и (3) оценка частоты ответа минимального остаточного заболевания (MRD) и скорость конверсии MRD с помощью многоцветной проточной цитометрии (MFC) и/или секвенирования следующего поколения (NGS).

Дальнейшие цели также будут включать в себя: (1) изучение продолжительности ответа MRD путем оценки аспирации костного мозга и исследования мазков периферической крови; (2) характеристику фармакокинетического профиля СС-90011 при введении в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (3) характеристику PD, чтобы понять механистические эффекты СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (4) изучение взаимосвязи между биомаркерами фармакокинетики, фармакопеи и/или клиническими исходами СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (5) оценку молекулярных и/или клеточных маркеров в костном мозге и крови, которые коррелируют с эффективностью СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; и (6) оценку степени независимости СС-90011 от трансфузии после исходного уровня в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином.

#### *A. 5-азациитидин*

**[0086]** 5-Азациитидин (обозначение Национального центра обслуживания NSC-102816; регистрационный номер CAS 320-67-2) также известен как азациитидин, AZA или 4-амино-1βD-рибофуранозил-1,3,5-триазин-2(1H)-он. Имеющийся на рынке продукт VIDAZA® (5-азациитидин для инъекций) содержит 5-азациитидин и предназначен для подкожного или внутривенного введения. 5-Азациитидин представляет собой пиримидиновый нуклеозидный аналог цитидина. 5-Азациитидин характеризуется следующей структурой:



5-Азациитидин.

**[0087]** После включения в реплицирующуюся ДНК 5-азациитидин образует ковалентный комплекс с ДНК-метилтрансферазами. ДНК-метилтрансферазы ответственны за метилирование ДНК *de novo* и за воспроизведение установленных паттернов метилирования в дочерних цепях ДНК реплицирующейся ДНК. Ингибирование ДНК-метилтрансфераз 5-азациитидином приводит к гипометилированию ДНК, тем самым восстанавливая нормальные функции морфологически диспластических, незрелых гемопоэтических клеток и раковых клеток за счет повторной экспрессии генов,

участвующих в регуляции нормального клеточного цикла, дифференцировке и гибели. Цитотоксические эффекты этих аналогов цитидина вызывают гибель быстро делящихся клеток, включая в себя раковые клетки, которые больше не реагируют на нормальные механизмы контроля клеточного роста. 5-азациитидин также встраивается в РНК. Цитотоксические эффекты 5-азациитидина могут быть обусловлены несколькими механизмами, включая в себя ингибирование синтеза ДНК, РНК и белка, встраивание в РНК и ДНК и активацию путей повреждения ДНК.

**[0088]** Инъекционный 5-азациитидин прошел клинические испытания и показал значительную противоопухолевую активность, такую как, например, при лечении миелодиспластических синдромов (MDS), острого миелогенного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), острого лимфолейкоза (ALL) и неходжкинской лимфомы (NHL). Смотрите, например, Aparicio et al., *Curr. Opin. Invest. Drugs* 3(4): 627-33 (2002).

**[0089]** 5-Азациитидин одобрен для подкожного (SC) или внутривенного (IV) введения для лечения различных пролиферативных нарушений. Пероральное дозирование изучалось в клинических испытаниях, таких как NCT00761722, NCT01519011, NCT00528982 и NCT01757535. Пероральные составы и способы лечения с использованием 5-азациитидина раскрыты в патенте США № 8846628, который включен посредством ссылки для раскрытия таких составов и способов лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят подкожно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе от около 75 мг/м<sup>2</sup> до около 100 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно, включая в себя около 75 мг/м<sup>2</sup>, около 80 мг/м<sup>2</sup>, около 85 мг/м<sup>2</sup>, около 90 мг/м<sup>2</sup>, около 95 мг/м<sup>2</sup> или около 100 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят подкожно или внутривенно ежедневно в течение первых семи дней 28-дневного цикла.

**[0090]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в форме капсулы или таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления таблетка представляет собой таблетку без энтеросолюбильного покрытия. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 110 мг, около 120 мг, около 130 мг, около 140 мг, около 150 мг, около 160 мг, около 170 мг, около 180 мг, около 190 мг, около 200 мг, около 210 мг, около 220 мг, около 230 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 260 мг, около

270 мг, около 280 мг, около 290 мг, около 300 мг, около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг, около 460 мг, около 470 мг, около 480 мг, около 490 мг, около 500 мг, около 510 мг, около 520 мг, около 530 мг, около 540 мг, около 550 мг, около 560 мг, около 570 мг, около 580 мг или около 600 мг перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе около 200 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе около 300 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят ежедневно перорально в течение первых семи, четырнадцати или двадцати одного дня 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят ежедневно перорально в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят субъекту один раз в день. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят субъекту два раза в день.

**[0091]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 200 мг в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 300 мг в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 200 мг в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 300 мг в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

**[0092]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально ежедневно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально ежедневно в течение 14 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в течение 21 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в течение 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в течение 21 или более дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней. Согласно некоторым вариантам

осуществления 5-азациитидин вводят перорально в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней.

**[0093]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 300 мг ежедневно в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 200 мг ежедневно в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 300 мг ежедневно в течение 21 дня с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально в дозе около 200 мг в день с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней.

**[0094]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, включающего в себя введение 5-азациитидина в день в течение 7 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, включающего в себя введение 5-азациитидина в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально с применением цикла лечения, включающего в себя введение 5-азациитидина в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

**[0095]** 5-азациитидин оказывает влияние на жизнеспособность клеток и эпигенетическое перепрограммирование клеток. Taylor and Jones, *Cell* 20(1):85-93 (1980). Считается, что в высоких дозах 5-азациитидин оказывает преимущественно острое цитотоксическое действие (Khan et al., *Experimental Hematology* 36(2): 149-57, 2008), в то время как в низких дозах он ингибирует клоногенность опухолевых клеток посредством дифференцировки (Tsai et al., *Cancer Cell*, 21(3): 430-46, 2012).

**[0096]** Продаваемый продукт VIDAZA®, инъекционный состав 5-азациитидина, вводят в относительно более высоких дозах и в течение более короткого периода времени по сравнению с пероральным составом 5-азациитидина с неэнтеросолюбильным покрытием, как описано в патенте США № 8846628, включая в себя СС-486. Клинические исследования показали, что СС-486 вызывает более устойчивые деметилирующие эффекты по сравнению с VIDAZA® (Laille et al., *PLOSOne* 10(8):e0135520, 2015), хотя кумулятивное воздействие 14- или 21-дневных схем введения СС-486 ниже, чем VIDAZA®, вводимого в течение 5 дней (García-Manero et al., *Leukemia* 30(4):889-96, 2016).

**[0097]** Чтобы изучить различия в цитотоксических и эпигенетических эффектах в зависимости от продолжительности воздействия 5-азациитидина, введение инъекционного

5-азациитидина с высокой экспозицией и ограниченной продолжительностью (HELD) сравнивали с введением перорального 5-азациитидина с низкой экспозицией и длительной продолжительностью (LEED). Для моделирования инъекционного и перорального дозирования азациитидина в неклинических системах общую экспозицию 5-азациитидина поддерживали постоянной при изменении продолжительности воздействия. Согласно некоторым вариантам осуществления для моделирования перорального введения 5-азациитидина 5-азациитидин доставляли в низкой экспозиции в течение длительного времени (LEED) в дозе 1 мг/кг один раз в день в течение пятнадцати дней (QD×15). Чтобы смоделировать ту же кумулятивную дозу при внутривенном или подкожном введении 5-азациитидина, 5-азациитидин вводили в высокой экспозиции в течение ограниченного времени (HELD) в дозе 3 мг/кг один раз в день в течение 5 дней (QD×5).

**[0098]** Согласно некоторым вариантам осуществления введение LEED 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает устойчивый фармакодинамический эффект и/или улучшение соблюдения пациентом схемы лечения. Устойчивый фармакодинамический эффект может включать в себя любое изменение, вызванное 5-азациитидином, которое включает в себя, например, деградацию MCL-1 и/или изменения в экспрессии гена ATF3 или SCD. Согласно некоторым вариантам осуществления LEED 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает снижение общего метилирования ДНК (например, за счет увеличения включения нуклеиновой кислоты), которое сохраняется до конца цикла лечения (т.е. 28-дневного цикла) по сравнению с HELD 5-азациитидин в комбинации с другими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления LEED 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает активацию синтезатора дифференцировки, которая достигает пика на 21-й день 28-дневного цикла и характеризуется гибелью клеток, которая характеризуется постепенной потерей жизнеспособности до 28-го дня 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления HELD 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает активацию маркера дифференцировки, которая достигает пика в день 7 28-дневного цикла и характеризуется гибелью клеток, которая характеризуется пиком в день 14 с последующим восстановлением в 28-дневном цикле. Согласно некоторым вариантам осуществления LEED 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает более высокую экспрессию маркеров миелоидной дифференцировки, которая включает в себя, без ограничения, CD11b, CD14, CD86, HLA-DR и MERTK, которая поддерживается на протяжении всего цикла лечения (т.е. 28-дневный цикл) по сравнению с HELD 5-азациитидина в комбинации с другими средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления LEED 5-азациитидина в комбинации с другими средствами обеспечивает

более выраженные эпигенетические изменения и более обширную дифференцировку по сравнению с HELD 5-азацитидина в сочетании с другими средствами.

### **III. Фармацевтические составы**

#### *A. 5-азацитидин*

**[0099]** Согласно некоторым вариантам осуществления способы в настоящем документе предусматривают введение конкретных пероральных составов, представленных в настоящем документе, например, для преодоления ограничений, связанных с внутривенным или подкожным введением 5-азацитидина. Например, внутривенное или подкожное введение может ограничивать способность регулярно доставлять 5-азацитидин в течение более длительных периодов времени, тем самым потенциально ограничивая максимальную эффективность 5-азацитидина. Из-за трудностей соблюдения строгих схем продолжительного внутривенного или подкожного введения дозы длительное подкожное или внутривенное введение 5-азацитидина может привести к тому, что субъекты (например, субъекты с множественной цитопенией) прекратят схему введения. Смотрите, например, Lyons et al., Hematologic Response to Three Alternative Dosing Schedules of Azacitidine in Patients With Myelodysplastic Syndromes, *J. Clin. Oncol.* (2009) (DOI:10.1200/JCO.2008.17.1058). Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе способы предусматривают введение перорального состава, представленного в настоящем документе, для преодоления этих или других ограничений, связанных с подкожным или внутривенным введением 5-азацитидина.

**[00100]** Определенные варианты осуществления в настоящем документе обеспечивают способы, предусматривающие введение представленных в настоящем документе пероральных составов 5-азацитидина, предусматривают доставку 5-азацитидина (например, азацитидина) в более низкой дозе в течение более длительного периода времени по сравнению с внутривенным или подкожным введением. Согласно конкретным вариантам осуществления такие способы предусматривают лечение дозозависимых цитопений (включая в себя, например, дозозависимые цитопении, связанные с азацитидином) путем введения представленного в настоящем документе перорального состава. Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе способы предусматривают введение представленного в настоящем документе перорального состава для достижения улучшенного профиля безопасности по сравнению с внутривенной или подкожной дозой, содержащей 5-азацитидин.

**[00101]** Варианты осуществления в настоящем документе охватывают фармацевтические составы и композиции, содержащие 5-азацитидин и усилитель проницаемости (или без усилителя проницаемости), причем составы и композиции готовят

для перорального введения. Конкретные варианты осуществления относятся к применению 5-азациитидина для приготовления фармацевтических составов и композиций для лечения определенных медицинских показаний, как предусмотрено в настоящем документе. Предлагаемые в настоящем документе фармацевтические составы и композиции, включающие в себя 5-азациитидин, предназначены для пероральной доставки 5-азациитидина нуждающимся в этом субъектам. Формы пероральной доставки включают в себя, без ограничения, таблетки, капсулы, капсуловидные таблетки, растворы, суспензии и сиропы.

**[00102]** Конкретные варианты осуществления в настоящем документе обеспечивают твердые пероральные лекарственные формы, которые представляют собой таблетки или капсулы. Согласно определенным вариантам осуществления состав представляет собой таблетку, содержащую 5-азациитидин. Согласно определенным вариантам осуществления состав представляет собой капсулу, содержащую 5-азациитидин. Согласно некоторым вариантам осуществления представленные в настоящем документе таблетки или капсулы содержат одно или несколько вспомогательных веществ или не нуждаются в одном или нескольких вспомогательных веществах, таких как, например, способствующие скольжению вещества, разбавители, смазывающие вещества, красители, разрыхлители, гранулирующие вещества, связующие вещества, полимеры и покрывающие средства. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе охвачено применение 5-азациитидина для приготовления фармацевтической композиции для лечения заболевания, связанного с аномальной пролиферацией клеток, причем композицию готовят для перорального введения.

*В. По меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство*

**[00103]** Согласно конкретным вариантам осуществления представленные в настоящем документе композиции 5-азациитидина дополнительно содержат одно, два, три или более других фармакологически активных веществ (также называемых в настоящем документе «дополнительными терапевтическими средствами», «вторыми активными средствами» или т.п.). Согласно некоторым вариантам осуществления композиции 5-азациитидина представляют собой пероральные составы. Согласно некоторым вариантам осуществления пероральные композиции 5-азациитидина по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством применяют для лечения любого из описанных в настоящем документе заболеваний или нарушений. Согласно конкретным вариантам осуществления представленные в настоящем документе пероральные составы содержат дополнительное терапевтическое средство(а) в терапевтически эффективном количестве.

**[00104]** Примеры дополнительных терапевтических средств включают в себя, без ограничения, гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и венетоклакс.

**[00105]** Примеры дополнительных терапевтических средств включают в себя, без ограничения, ингибиторы FLT3, ингибиторы IDH2, ингибиторы IDH1 и ингибиторы BCL2. Примеры ингибиторов FLT3 первого поколения включают в себя, без ограничения, мидостаурин, лестауртиниб, сунитиниб (Sutent®) и сорафениб (Nexavar®). Примеры ингибиторов FLT3 второго поколения включают в себя, без ограничения, квизартиниб, креноланиб, пексидартиниб (PLX3397) и гилтеритиниб (ASP2215), которые являются более эффективными и селективными, чем ингибиторы первого поколения. Примеры ингибиторов IDH, включая в себя ингибиторы IDH1 и/или IDH2, включают в себя, без ограничения, ивосидениб и энаседениб. Примеры ингибиторов BCL2 включают в себя, без ограничения, венетоклакс (ABT-199), навитоклакс (ABT-263), ABT-737 (4-[4-[[2-(4-хлорфенил)фенил]метил]пиперазин-1-ил]-N-[4-[[2R)-4-(диметиламино)-1-фенилсульфанилбутан-2-ил]амино]-3-нитрофенил]сульфонилбензамид), обатоклакса мезилат (GX15-070), TW-37 (N-[4-(2-трет-бутилфенил)сульфонилфенил]-2,3,4-тригидрокси-5-[(2-пропан-2-илфенил)метил]бензамид), AT101 ((R)-(-)-госсипол), HA14-1 (этиловый эфир 2-амино-6-бром- $\alpha$ -циано-3-(этоксикарбонил)-4H-1-бензопиран-4-уксусной кислоты) и сабутоклакс.

**[00106]** Примеры дополнительных терапевтических средств включают в себя, без ограничения, гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и венетоклакс. Примером дополнительного терапевтического средства является венетоклакс.

*С. Венетоклакс как по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство*

**[00107]** Согласно некоторым вариантам осуществления пероральная фармацевтическая композиция, содержащая 5-азацитидин, используется с венетоклаксом в качестве дополнительного терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления композиции для перорального применения на основе 5-азацитидина используются с венетоклаксом для лечения любого из заболеваний или нарушений, описанных в настоящем документе.

**[00108]** Венетоклакс представляет собой низкомолекулярный ингибитор BCL-2 и продается как VENCLEXTA™ в форме таблетки. Венетоклакс показан: (i) для лечения взрослых пациентов с хроническим лимфолейкозом (CLL) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL); (ii) в комбинации с инъекционным 5-азацитидином или децитабином, или низкими дозами цитарабина для лечения недавно диагностированного

острого миелоидного лейкоза (AML) у взрослых в возрасте 75 лет и старше или имеющих сопутствующие заболевания, препятствующие использованию интенсивной индукционной химиотерапии.

**[00109]** Терапию венетоклаксом начинают в соответствии с графиком еженедельного повышения в течение определенного периода в несколько дней или недель до рекомендуемой суточной дозы. Для лечения CLL и SLL венетоклаксом назначают в суточной дозе 20 мг в течение недели 1, в суточной дозе 50 мг в течение недели 2, в суточной дозе 100 мг в течение недели 3, в суточной дозе 200 мг в течение недели 4 и суточной дозы 400 мг в течение недели 5 и далее. Для лечения AML в составе комбинированной терапии с другим средством, таким как инъекционный 5-азациитидин, венетоклаксом вводят в суточной дозе 100 мг в день 1, в суточной дозе 200 мг в день 2 и в суточной дозе 400 мг в день 3 и далее. Инъекционный 5-азациитидин вводят 28-дневными циклами, начиная с 1-го дня лечения венетоклаксом, в дозе  $75 \text{ мг/м}^2$ , внутривенно или подкожно, в дни 1-7 каждого цикла.

**[00110]** Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклаксом вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклаксом вводят в форме таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклаксом вводят ежедневно. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклаксом вводят в дозе от около 20 мг до около 400 мг, например, около 20 мг, около 50 мг, около 100 мг, около 200 мг или около 400 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклаксом вводят в дозе около 400 мг.

**[00111]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и венетоклаксом вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и венетоклаксом вводят последовательно. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда 5-азациитидин и венетоклаксом вводят последовательно, 5-азациитидин вводят первым. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и венетоклаксом вводят в виде отдельных лекарственных форм, таких как инъекции, подходящие для внутривенного или подкожного применения, и/или таблетки или капсулы для перорального применения. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и венетоклаксом входят в состав одной лекарственной формы, такой как инъекция, подходящая для внутривенного или подкожного применения, или таблетка или капсула для перорального применения.

#### *D. Ингибитор LSD-1*

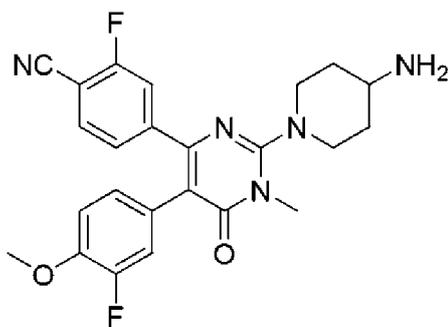
**[00112]** Недавние исследования показали, что выживаемость лейкемических стволовых клеток (LSC), вероятно, играет главную роль в механизме рецидива заболевания и, в конечном счете, резистентности к терапии. Текущие способы лечения могут сохранить

LSC, которые позволяют регенерировать опухоль с помощью предраковых или злокачественных клонов. Соответственно, эрадикация LSC может привести к увеличению долгосрочной выживаемости. Кроме того, было показано, что активность лизин-специфической деметилазы 1A (LSD1) присутствует и повышена в компартменте LSC, что предполагает, что ингибирование активности LSD1 потенциально может уничтожить компартмент LSC.

**[00113]** Варианты лечения для пациентов, которым не подходит интенсивная индукционная химиотерапия, ограничены, и пациенты, которым не подходит интенсивная индукционная химиотерапия, имеют худшие результаты выживания по сравнению с теми, кто достаточно подходит для стандартной интенсивной индукционной химиотерапии. Хотя комбинированные схемы с использованием азацитидина и другого дополнительного терапевтического средства, такого как венетоклакс, улучшают показатели ответа в этой популяции пациентов по сравнению с предыдущими схемами, добавление ингибитора лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) может избирательно ингибировать aberrantную экспрессию. LSD1 участвует в патогенезе AML и размножении популяции стволовых клеток AML и вызывает более глубокие и длительные ответы.

**[00114]** Соответственно, настоящее раскрытие также относится к способам применения (i) композиции, содержащей 5-азацитидин с лизин-специфическим ингибитором деметилазы-1 (LSD-1) и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, таким как венетоклакс, при заболеваниях и нарушениях, включая в себя AML. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты, которые проходят лечение, представляют собой субъекты с AML, ранее не получавшие лечения, в возрасте  $\geq 75$  лет и/или в возрасте  $\geq 60-74$  лет и имеющие сопутствующие заболевания, препятствующие применению интенсивной индукционной химиотерапии.

**[00115]** Согласно описанным в настоящем документе вариантам осуществления, которые включают в себя использование ингибитора LSD-1, ингибитор LSD-1 представляет собой соединение, характеризующееся структурой:



или его фармацевтически приемлемую соль. Химическое название вышеуказанного соединения: 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрил с химической формулой  $C_{23}H_{21}F_2N_5O_2$ , молекулярной массой 437,44 и номером CAS 1821307-10-1. 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрил описан в патенте США № US 9255097.

**[00116]** Согласно любому из описанных в настоящем документе вариантов осуществления ингибитор LSD-1 можно вводить перорально. Пероральные дозы, как правило, могут находиться в диапазоне от около 1,0 мг до около 1000 мг от одного до четырех или более раз в день. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят в дозах около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг. Согласно любому из описанных в настоящем документе вариантов осуществления ингибитор LSD-1 можно вводить в форме таблетки или капсулы. Согласно любому из описанных в настоящем документе вариантов осуществления ингибитор LSD-1 можно вводить один раз в неделю. Согласно любому из описанных в настоящем документе вариантов осуществления ингибитор LSD-1 можно вводить в дозе около 60 мг.

#### **IV. Способы лечения**

**[00117]** Как описано в настоящем документе, некоторые варианты осуществления в настоящем документе обеспечивают способы лечения субъекта-человека, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), причем способ предусматривает введение субъекту комбинации (i) фармацевтической композиции, содержащей 5-азацитидин, (ii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства и (iii) ингибитора лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой соли.

**[00118]** Нуждающиеся в лечении субъекты могут представлять собой членов популяции пациентов с повышенным риском AML. Например, несколько наследственных генетических нарушений и иммунодефицитных состояний связаны с повышенным риском AML. К ним относятся нарушения с дефектами стабильности ДНК, приводящие к случайным поломкам хромосом, такие как синдром Блума, анемия Фанкони, родство Ли-Фраумени, атаксия-телеангиэктазия и X-сцепленная агаммаглобулинемия.

**[00119]** Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы можно использовать для лечения определенных типов AML. Иллюстративные типы AML включают в себя, без ограничения, AML с рецидивирующими генетическими аномалиями, AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные новообразования, связанные с терапией, миелоидную саркому, миелоидные

пролиферации, связанные с синдромом Дауна, бластное плазмацитоидное дендритное клеточное новообразование и/или острый промиелоцитарный лейкоз.

**[00120]** Согласно некоторым вариантам осуществления AML характеризуется наличием любой из следующих мутаций: родственная Fms тирозинкиназа 3 (FLT3), гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен (KRAS), гомолог вирусного онкогена нейробластомы RAS (V-Ras) (NRAS), протоонкоген c-Kit (KIT), протеинтирозинфосфатаза нерецепторного типа 11 (PTPN11), нейрофибромин 1 (NF1), ДНК-метилтрансфераза 3A (DNMT3A), изоцитратдегидрогеназа 1 (IDH1), изоцитратдегидрогеназа 2 (IDH2), транслокация ten-eleven-2 (TET2), additional sex comb-like 1 (ASXL1), энхансер гомолога zeste 2 (EZH2), лейкоз смешанного происхождения 1/гистон-лизин N-метилтрансфераза 2A (MLL/KMT2A), нуклеофосмин (NPM1), связывающий энхансер ССААТ белок альфа (CEBPA), родственный runt фактор транскрипции 1 (RUNX1), GATA-связывающий фактор 2 (GATA2), опухолевый белок p53 (TP53), богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 2 (SRSF2), вспомогательный фактор 1 малой ядерной РНК U2 (U2AF1), субъединица 1 фактора сплайсинга 3b (SF3B1), цинковый палец (тип CCCH), РНК-связывающий мотив и богатый серином/аргинином 2 (ZRSR2), RAD21 компонент комплекса когезина (RAD21), стромальный антиген 1 (STAG1), стромальный антиген 2 (STAG2), структурное поддержание хромосом 1A (SMC1A) и структурное поддержание хромосомного белка 3 (SMC3).

**[00121]** Согласно некоторым вариантам осуществления AML характеризуется наличием мутации FLT3-ITD. Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят по меньшей мере перед одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления AML отвечает на лечение ингибитором FLT3. Согласно некоторым вариантам осуществления AML характеризуется сверхэкспрессией MCL-1.

**[00122]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин инициирует апоптоз раковых клеток, опосредованный по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, путем подавления экспрессии MCL-1. Согласно некоторым вариантам осуществления снижение экспрессии MCL-1 опосредовано зависимыми и независимыми от каспаз механизмами. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство усиливают деградацию MCL-1.

**V. Способы применения с 5-азациитидином, дополнительным терапевтическим средством и ингибитором LSD-1**

**[00123]** Согласно одному аспекту представлен способ лечения заболеваний и нарушений, включая в себя AML, с использованием фармацевтической композиции, содержащей 5-азациитидин в комбинации с лизин-специфическим ингибитором деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой солью, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, таким как венетоклак. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект не подходит для интенсивной индукционной химиотерапии.

**[00124]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство входят в состав одной лекарственной формы. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно. Согласно некоторым вариантам осуществления одновременно вводят по меньшей мере одно терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно.

**[00125]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят подкожно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе от около  $75 \text{ мг/м}^2$  до около  $100 \text{ мг/м}^2$  подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  подкожно или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят подкожно или внутривенно ежедневно в течение первых 7 дней 28-дневного цикла.

**[00126]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе

около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 550 мг или 600 мг перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 200 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в дозе около 300 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят перорально в течение первых семи, четырнадцати или двадцати одного дня цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят субъекту один или два раза в день. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин вводят в форме капсулы или таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления таблетка представляет собой таблетку без энтеросолюбильного покрытия.

**[00127]** Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из гилтеритиниба, мидостаурина, квизартиниба, эназидениба, ивозидениба или венетоклакса. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой венетоклакс.

**[00128]** Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят в форме таблетки. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят ежедневно. Согласно некоторым вариантам осуществления венетоклакс вводят в дозе около 400 мг.

**[00129]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азацитидин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемая соль обеспечивают синергический эффект для лечения раскрытых в настоящем документе заболеваний. Синергизм может быть измерен с использованием модели Наиболее эффективного единственного средства (HSA) и пакета Combenefit (Di Veroli et al., *Bioinformatics*. 2016 Sep 15;32(18):2866-8.). Клеточная линия отрицательного контроля используется в качестве контроля для того, чтобы определить, имело ли место смещение  $EC_{50}$  и/или усиление максимального ингибирующего эффекта. Другими словами,  $EC_{50}$  и максимальный ингибирующий эффект клеточной линии отрицательного контроля обеспечивают исходные результаты активности, а сдвиг в  $EC_{50}$  и максимальном ингибирующем эффекте комбинации лекарственных средств сравнивают с результатами клеточной линии отрицательного контроля, чтобы определить, действительно ли комбинация лекарственных средств дала синергический эффект. В частности, для определения синергических взаимодействий между двумя лекарственными средствами используются следующие стадии: (а) демонстрация сдвига кривых доза-ответ, определенных по их  $EC_{50}$  (т.е. сдвиг активности) и/или усиление максимального ингибирующего эффекта по сравнению с результатами от клеточной линии отрицательного

контроля; (b) анализ характеристических поверхностей для визуализации синергизма, аддитивности или антагонизма по матрице концентраций между двумя лекарственными средствами и (c) анализ балла показателя аддитивности (полученного с использованием программного приложения Combenefit). Предел, при котором индекс синергизма становится значимым (таким, что комбинация лекарственных средств проявляет синергетический эффект), определяется эмпирически и основывается на дисперсии данных и подтверждении изменения активности в  $EC_{50}$ . Другими словами, комбинированный индекс без явного сдвига кривых доза-эффект не будет представлять собой синергетическое взаимодействие. Как используется в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления синергетический эффект определяется как наличие сдвига  $EC_{50}$  выше чем около 4 и/или индекса синергизма выше чем около 20 при измерении с помощью модели HSA и пакета Combenefit.

**[00130]** Согласно некоторым вариантам осуществления AML характеризуется наличием мутации FLT3-ITD. Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления AML устойчив к лечению только ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью.

**[00131]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00132]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином отдельно. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и их фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на

60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00133]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с применением по меньшей мере только одного дополнительного терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению по меньшей мере только с одним дополнительным терапевтическим средством около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00134]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним венетоклаксом. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним венетоклаксом около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00135]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на

85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00136]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00137]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00138]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%,

около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом

**[00139]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00140]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и венетоклакс увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и венетоклаксом. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин, вводимый перорально, и венетоклакс увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и венетоклаксом около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00141]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-

азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00142]** Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, венетоклакса, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100% при измерении любым клинически признанным способом.

**[00143]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения проводят в течение одного или нескольких циклов, включая в себя один, два, три, четыре и более. Согласно некоторым вариантам осуществления один цикл составляет около 7 дней, около 14 дней, около 21 день или около 28 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления один цикл представляет собой период около 28 дней.

**[00144]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят субъекту подкожно или внутривенно один раз в день в течение первых около 7 дней около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят субъекту подкожно или внутривенно один раз в день в дни 1-7 около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят субъекту подкожно или внутривенно один раз в день в течение семи последовательных дней около 28-дневного цикла.

**[00145]** Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту около один раз в неделю в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту около в дни 1, 8, 15 и 22 около

28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту около в дни 7, 14, 21 и 28 около 28-дневного цикла.

**[00146]** Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту один раз в день в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство около в дни 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 и 28 в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой венетоклакс.

**[00147]** Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе от около  $75 \text{ мг/м}^2$  до около  $100 \text{ мг/м}^2$ , включая в себя около  $75 \text{ мг/м}^2$ , около  $80 \text{ мг/м}^2$ , около  $85 \text{ мг/м}^2$ , около  $90 \text{ мг/м}^2$ , около  $95 \text{ мг/м}^2$  или около  $100 \text{ мг/м}^2$ , предпочтительно подкожно или внутривенно, один раз в день в течение первых семи дней около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления 5-азациитидин вводят в дозе от около  $75 \text{ мг/м}^2$  до около  $100 \text{ мг/м}^2$ , включая в себя около  $75 \text{ мг/м}^2$ , около  $80 \text{ мг/м}^2$ , около  $85 \text{ мг/м}^2$ , около  $90 \text{ мг/м}^2$ , около  $95 \text{ мг/м}^2$  или около  $100 \text{ мг/м}^2$ , предпочтительно подкожно или внутривенно, один раз в день в течение 7 дней подряд из около 28-дневного цикла.

**[00148]** Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту в дозе от около 20 мг до 60 мг, включая в себя около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг или около 60 мг один раз в неделю около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту в дозе от около 20 мг до 60 мг, включая в себя около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг или около 60 мг, один раз в день в дни 1, 8, 15 и 22 около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор LSD-1 вводят субъекту в дозе от около 20 мг до 60 мг, включая в себя около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг или около 60 мг, один раз в день в дни 7, 14, 21 и 28 около 28-дневного цикла.

**[00149]** Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) вводят субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг один раз в день в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) вводят субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг один раз в день около в дни 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 и 28 около 28-дневного цикла.

**[00150]** Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) в дозе от

около 100 мг до около 400 мг, включая в себя около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг или около 400 мг один раз в день в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) вводят субъекту в дозе от около 100 мг до около 400 мг, включая в себя около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг и около 400 мг один раз в день около в дни 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 и 28 около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) в дозе около 400 мг один раз в день в течение около 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) в дозе около 400 мг один раз в день около в дни 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 и 28 около 28-дневного цикла.

**[00151]** Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, венетоклакс) в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг около в дни 4-28 около 28-дневного цикла.

**[00152]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: введение 5-азациитидина подкожно или внутривенно субъекту один раз в день в течение первых 7 дней 28-дневного цикла; введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[00153]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) введение 5-азациитидина подкожно или внутривенно субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

**[00154]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает: (a) введение 5-азациитидина в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (c)

введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[00155]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает одновременное введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

**[00156]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) введение 5-азацитина в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (c) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

**[00157]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) пероральное введение 5-азацитина субъекту один раз в день в течение первых 14 дней 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[00158]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (a) пероральное введение 5-азацитина субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 28-дневного цикла; (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и (c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

**[00159]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает: (a) введение 5-азацитина в дозе около 300 мг каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (c) введение субъекту ингибитора LSD-1

в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

**[00160]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает: (а) введение 5-азациитидина в дозе около 200 мг каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (с) введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

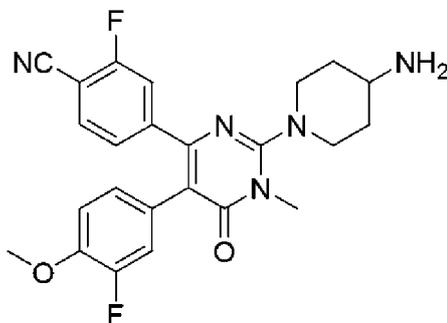
**[00161]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает одновременное введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

**[00162]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (а) введение 5-азациитидина в дозе около 300 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (с) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

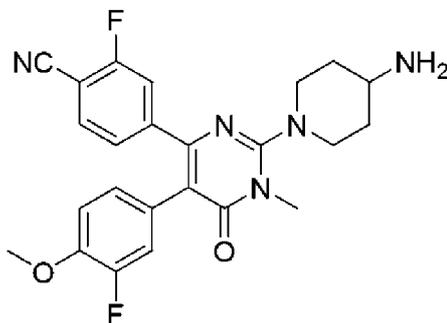
**[00163]** Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает: (а) введение 5-азациитидина в дозе около 200 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или (b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или (с) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла. Согласно некоторым вариантам осуществления введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

**[00164]** Также согласно другому аспекту представлен способ лечения субъекта, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), который не подходит для интенсивной

индукционной химиотерапии, причем способ предусматривает введение субъекту: (i) в первом непрерывном 28-дневном цикле: (a) 5-азацитина подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7; (b) венетоклакса перорально в дозе около 100 мг в день 1; около 200 мг в день 2 и около 400 мг в день в дни с 3 по 28; и (c) фармацевтической композиции, содержащей безилатную соль следующего соединения:



в дни 1, 8, 15 и 22; и (ii) в последующих 28-дневных циклах: (d) 5-азацидин подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7 каждого последующего цикла; (e) венетоклакс перорально в дозе около 400 мг в дни с 1 по 28 каждого последующего цикла и (f) фармацевтическую композицию, содержащую безилатную соль следующего соединения



в дни 1, 8, 15 и 22 каждого последующего цикла.

**[00165]** Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в течение первого непрерывного 28-дневного цикла и последующих 28-дневных циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 60 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[00166]** Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят в дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах. Согласно некоторым вариантам осуществления, если доза 20 мг является переносимой, тогда открывается когорта второй дозы, в которой

фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[00167]** Согласно некоторым вариантам осуществления, если доза 40 мг является переносимой, открывается когорта третьей дозы, в которой фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

**[00168]** Включение посредством ссылки: все описания (например, патенты, публикации и веб-страницы), на которые есть ссылки в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки. Кроме того, следующие раскрытия также полностью включены в настоящее описание посредством ссылки: (1) реферат постера ASCO 2008 г. Skikne et al., *Leukemia*, 2008, 22, 1680-84.

## **VI. Определения**

**[00169]** Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, характеризуются тем же значением, которое обычно понимается специалистом в настоящей области техники. Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[00170]** Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, единственное число включают в себя ссылки как во множественном, так и в единственном числе, если из контекста явно не следует иное.

**[00171]** Термин «около» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определенную специалистом в настоящей области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряется или определяется. Согласно некоторым вариантам осуществления термин «около» или «приблизительно» означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений. Согласно некоторым вариантам осуществления термин «около» или «приблизительно» означает в пределах 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или 0,05% от заданного значения или диапазона.

**[00172]** Используемые в настоящем документе и если не указано иное, термины «лечить» и «лечение» относятся к устранению или облегчению заболевания или нарушения или одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или нарушением. Согласно некоторым вариантам осуществления термины относятся к минимизации распространения или ухудшения заболевания или нарушения в результате введения одного или нескольких профилактических или терапевтических средств субъекту с таким заболеванием или нарушением. Согласно некоторым вариантам осуществления термины относятся к введению соединения или лекарственной формы, представленных в настоящем

документе, с одним или несколькими дополнительными активными средствами или без них после появления симптомов конкретного заболевания.

**[00173]** Используемые в настоящем документе и если не указано иное, термины «предотвращать», «предотвращение» и «профилактика» относятся к предупреждению возникновения рецидива или распространения заболевания или нарушения или одного или нескольких его симптомов. Согласно некоторым вариантам осуществления термины относятся к лечению или введению соединения или лекарственной формы, представленных в настоящем документе, с одним или несколькими другими дополнительными активными средствами или без них до появления симптомов, особенно у субъектов с риском заболевания или нарушения, предусмотренные в настоящем документе. Эти термины охватывают ингибирование или уменьшение симптома конкретного заболевания. Субъекты с семейным анамнезом заболевания, в частности, являются кандидатами для профилактических схем согласно определенным вариантам осуществления. Кроме того, субъекты, у которых в анамнезе есть повторяющиеся симптомы, также являются потенциальными кандидатами на профилактику. В этом отношении термин «профилактика» может использоваться взаимозаменяемо с термином «профилактическое лечение».

**[00174]** Используемые в настоящем документе и если не указано иное, термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» соединения означают количество, достаточное для обеспечения терапевтического эффекта при лечении или контроле заболевания или нарушения или для отсрочки или минимизации одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или нарушением. «Терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» соединения означают количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими средствами, которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении или контроле заболевания или нарушения. Термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» могут охватывать количество, которое улучшает общую терапию, уменьшает или устраняет симптомы или причины заболевания или нарушения или повышает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства.

**[00175]** Используемый в настоящем документе и если не указано иное, «профилактически эффективное количество» соединения представляет собой количество, достаточное для предотвращения заболевания или нарушения или предотвращения его рецидива. Профилактически эффективное количество соединения означает количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими средствами, которое обеспечивает профилактическую пользу при предупреждении

заболевания. Термин «профилактически эффективное количество» может охватывать количество, которое улучшает общую профилактику или усиливает профилактическую эффективность другого профилактического средства.

**[00176]** «Опухоль», как используется в настоящем документе, относится ко всем видам неопластического клеточного роста и пролиферации, злокачественным или доброкачественным, а также ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Используемый в настоящем документе термин «неопластический» относится к любой форме нерегулируемого роста клеток, будь то злокачественный или доброкачественный, приводящий к аномальному росту ткани. Таким образом, «неопластические клетки» включают в себя злокачественные и доброкачественные клетки с нерегулируемым клеточным ростом.

**[00177]** Используемые в настоящем документе термины «композиция», «состав» и «лекарственная форма» предназначены для охвата композиций, содержащих указанный(е) ингредиент(ы) (в указанных количествах, если указано), а также любой продукт(ы), которые прямо или косвенно являются результатом комбинации указанного(ых) ингредиента(ов) в указанном(ых) количестве(ах). Под «фармацевтическим» или «фармацевтически приемлемым» подразумевается, что любой разбавитель(и), вспомогательное вещество(а) или носитель(и) в композиции, составе или лекарственной форме совместимы с другим ингредиентом(ами) и не вредны для его получателя. Если не указано иное, термины «композиция», «состав» и «лекарственная форма» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

**[00178]** Термин «не покрытые энтеросолюбильной оболочкой» при использовании в настоящем документе относится к фармацевтической композиции, составу или лекарственной форме, которые не содержат покрытия, предназначенного для высвобождения активного ингредиента(ов) за пределами желудка (например, в кишечнике). Согласно некоторым вариантам осуществления композиция, состав или лекарственная форма, не покрытая энтеросолюбильной оболочкой, предназначены для высвобождения активного ингредиента(ов) по существу в желудке.

**[00179]** Термин «субъект», как определено в настоящем документе, представляет собой человека.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### **Материалы и способы:**

*Клетки, условия культивирования и реагенты*

**[00180]** Линии клеток AML приобретали в Американской коллекции культур тканей (ATCC) или получали из банка основных клеточных линий Celgene. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% или 20% фетальной телячьей сыворотки и 10 мМ L-глутамин при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. BaF3-FLT3wt, BaF3-FLT3ITD, BaF3-FLT3D538Y производили Kyinno (Пекин, Китай). Клетки выращивали в RPMI с 10% FBS с 0,5 мкг/мл пуромицина. Для всех исследований *in vitro* использовали экспоненциально растущие клетки. 5-азациитидин (10 мМ в ДМСО) получали из банка коллекций соединений Celgene, получали из банка коллекций соединений Celgene. Гилтеритиниб (ASP2215), мидостаурин (PKC412), венетоклак (ABT-199), квизартиниб (AC220), ингибитор рап-каспазы Z-VAD-FMK приобретали у Selleckchem (Хьюстон, Техас) и восстанавливали в виде 10 мМ маточного раствора в ДМСО.

*Анализ жизнеспособности клеток*

**[00181]** Клетки высевали в 384-луночные планшеты (Coming № в каталоге 3764) по 2000 клеток/лунку в 50 мкл среды. Относительное количество клеток, рассчитанное как % контрольной лунки с ДМСО, измеряли с помощью Cell Titer-Glow (Promega, Madison, WI) в соответствии с инструкциями производителя. Значения люминесценции количественно определяли в указанное время с использованием планшет-ридера EnvVision (PerkinElmer). Клетки обрабатывали ежедневно 5-азациитидином в течение трех дней и/или однократно мидостаурином, гилтеритинибом или венетоклаксом. Девять доз 5-азациитидина, титрованных в зависимости от чувствительности к 5-азациитидину, объединяли с шестью дозами второго оцениваемого лекарственного средства, что дало 54 возможных комбинации, каждую из которых оценивали в двух повторах для каждого эксперимента. Prism версии 7.03 (Prism Software Corporation) использовали для расчета значений EC<sub>50</sub>.

*Анализ данных комбинированных эффектов*

**[00182]** Выживаемость клеток строили как функцию концентрации лекарственного средства и использовали для расчета значений EC<sub>50</sub> с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, Калифорния). Показатели синергизма рассчитывали с помощью модели самого высокого уровня с одним средством и программного обеспечения Combenefit. Combenefit: интерактивная платформа для анализа и визуализации комбинаций лекарственных средств (Di Veroli et al., Bioinformatics. 2016 Sep 15;32(18):2866-8).

*Вестерн-блоты*

**[00183]** После обработки 5-азациитидином и/или ингибиторами в указанных дозах/время белок собирали с использованием лизирующего буфера (Cell Signaling, #9803,

Cell Signaling Technologies, Danvers, MA), содержащего 1 мМ PMSF. Лизаты количественно определяли с использованием набора с бисинхониновой кислотой (BCA) (Pierce/Thermo Fisher, Waltham, MA). От 20 до 30 мкг белка разделяли на 4-12% геле ДСН-ПААГ, переносили на мембраны PVDF (80 В/90 минут путем влажного переноса) и блокировали блокирующим буфером Odyssey TBS в течение 1 часа, а затем исследовали соответствующими первичными антителами в течение ночи при температуре 4°C, используя разбавление, рекомендованное производителем. Мембраны промывали три раза в общей сложности 30 минут, а затем инкубировали со вторичными антителами при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа. После еще трех промывок систему инфракрасной визуализации Odyssey и сопутствующее программное обеспечение (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, USA) использовали для сканирования мембран иммуноблотов и количественной оценки интенсивности полос в соответствии с инструкциями производителя. Отношение представляющих интерес белков к контрольной загрузке в обработанных образцах нормализовали к соответствующему соотношению в необработанных клетках. Антитела, используемые для иммуноблоттинга, приобретали из следующих источников: BCL-2 (sc-7382), MCL1- (sc-819) от Santa Cruz Biotechnology (Даллас, Техас, США), Bim (2819), каспаза-3 (9664) от Cell Signaling Technology; бета-актин (A2228) от Sigma-Aldrich; DNMT1 (ab188453) от AbCam; козы антитела к кроличьим IRDye 680 и козы вторичные антитела к мышинным IRDye 800 (#925-68073 и #925-32212) приобретали у Li-COR Biosciences (Линкольн, Небраска).

#### *Проточная цитометрия*

**[00184]** PE мышинное моноклональное антитело к CD14 человека (клон M5E2, № в каталоге 101235, Biolegend), FITC-конъюгированные мышинные моноклональные антитела к человеческому CD86 (клон 2331, № в каталоге 560958, BD Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния) использовали для окрашивания FACS в разведении 1:200. Образцы FACS получали с помощью BD FACSCanto II. Жизнеспособность клеток также исследовали с помощью анализа FACS с красителем Fixable Viability 780 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце,  $10^5$  клеток высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном, на следующий день обрабатывали 9 дозами CC-90011 (начиная с 10 мкМ, 3-кратное разведение вниз), клетки инкубировали при температуре 37°C в течение 6 дней и собирали для окрашивания. Клетки один раз промывали DPBS и окрашивали 1-кратным FVS780 и дважды промывали окрашивающим буфером. Образцы окрашивали поверхностными антителами в разведении 1:200. Затем результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo V10 (TreeStar Inc., Ashland, OR). Процент живых для всех положительных поверхностных маркеров

использовали для расчета значений  $EC_{50}$ , нормализованных к образцам, обработанным ДМСО, как 100% для контроля кривой.

#### *Анализ RNASeq*

**[00185]** Клетки MV4-11 обрабатывали PBS или 1 мкМ 5-азациитидина в течение 24 часов или ежедневно 1 мкМ 5-азациитидина в течение 48 часов в трех повторах. После обработки клетки извлекали, один раз промывали в PBS и мгновенно замораживали в виде осадка клеток. Осадки клеток отправляли в Canopy Biosciences для выделения РНК, подготовки библиотеки и секвенирования. РНК выделяли с помощью набора Qiagen RNeasy Mini Kit в соответствии с инструкциями производителя. Модифицированный протокол использовали для сохранения видов микроРНК. Библиотеки Total RNA Seq готовили с использованием 200 нг общей РНК и набора для подготовки направленной библиотеки NEBNext Ultra II. Истощение рРНК проводили с использованием способа, основанного на РНКазе-Н (New England Biolabs, Ipswich, MA). Уровни РНК MCL1 в других клеточных линиях определяли количественно с помощью RNASeq с использованием стандартных способов.

**[00186]** Библиотеки мультиплексировали и секвенировали с использованием Illumina HiSeq. Затем все подсчеты генов импортировали в пакет R/Bioconductor EdgeR, и рассчитывали коэффициенты размера нормализации TMM, чтобы скорректировать образцы с учетом различий в размере библиотеки. Рибосомные гены и гены, не экспрессированные в наименьшем размере группы минус один образец, превышающем один отсчет на миллион, исключали из дальнейшего анализа. Затем проводили анализ дифференциальной экспрессии для анализа различий между условиями, и результаты отфильтровывали только для тех генов, у которых р-значения с поправкой на частоту ложных открытий Бенджамини-Хохберга были меньше или равны 0,05. Глобальные возмущения в известных терминах Gene Ontology (GO) и путях KEGG обнаруживали с использованием пакета GAGE R/Bioconductor для проверки изменений в выражении зарегистрированных логарифмических 2-кратных изменений, о которых сообщалось посредством Limma, в каждом термине по сравнению с фоновыми логарифмическими 2-кратными изменениями всех генов, найденных за пределами соответствующего термина. Тепловую карту пакета R/Bioconductor и Pathview использовали для отображения тепловых карт или аннотированных графиков KEGG по группам образцов для каждого термина GO или пути KEGG (соответственно) с поправкой на коэффициент ложных открытий Бенджамини-Хохберга р-значения меньше или равного 0,05. Чтобы найти гены с дифференциальной экспрессией, необработанные подсчеты стабилизировали по дисперсии с помощью пакета R/Bioconductor DESeq2.

**[00187]** Для проверки экспрессии ATF3 и SCD клетки MV4-11 обрабатывали PBS или 0,3 мкМ 5-азациитидина, 1 мкМ 5-азациитидина или 3 мкМ 5-азациитидина в течение 24 часов и 48 часов. В это время клетки извлекали и выделяли РНК с использованием набора Qiagen RNeasy в соответствии с инструкциями производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript VILO. Проверенные зонды Taqman и Taqman Fast Advanced Master Mix использовали с системой ПЦР в реальном времени Viia 7 (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) для количественного определения транскриптов ATF3, SCD и мРНК 18S.

*Сайленсинг генов интерферирующей РНК*

**[00188]** ATF3, SCD или контрольные siRNA Silencer Select (16 нМ siRNA, Invitrogen) трансфицировали в клетки MV4-11 с использованием липофектамина 2000 в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Необработанные клетки имитировали трансфекцию без siRNA. Затем клетки обрабатывали различными концентрациями 5-азациитидина ежедневно в течение 3 дней. В день 4 клетки обрабатывали венетоклаксом, а затем в день 7 проверяли жизнеспособность клеток с помощью Cell Titer Glo в соответствии с протоколом производителя. Синергизм рассчитывали с помощью Combenefit и сравнивали с помощью анализа Highest Single Agent.

**[00189]** Нокдаун гена проводили на клетках, трансфицированных siRNA, через 72 часа после трансфекции (без обработки 5-азациитидином или венетоклаксом). РНК экстрагировали с использованием набора Qiagen RNeasy, а обратную транскрипцию проводили с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript VILO. Проверенные зонды Taqman и Taqman Fast Advanced Master Mix использовали с системой ПЦР в реальном времени Viia 7 (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) для количественного определения транскриптов ATF3, SCD и мРНК 18S.

*Анализ двойной комбинации 5-азациитидина и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства*

**[00190]** Как используется в примерах, LEED относится к доставке 5-азациитидина в низкой экспозиции в течение длительного времени (LEED) в дозе 1 мг/кг один раз в день в течение пятнадцати дней (QD×15). Чтобы доставить ту же кумулятивную дозу 5-азациитидина, 5-азациитидин вводят в высокой экспозиции в течение ограниченного периода времени (HELD) в дозе 3 мг/кг один раз в день в течение пяти дней (QD×5). LEED моделирует пероральное введение AZA, а HELD моделирует внутривенное или подкожное введение AZA.

**[00191]** Эксперименты проводили в Charles River Laboratories (Морисвилл, Северная Каролина) с самками мышей NOD/SCID (NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl, Charles River) в

возрасте восьми недель с массой тела (МТ) в диапазоне от 17,6 до 28,4 г в день 1 исследования. Животным давали воду без ограничений (обратный осмос, 1 ч./млн Cl) и модифицированный и облученный лабораторный рацион NIH 31, состоящий из 18,0% сырого белка, 5,0% сырого жира и 5,0% сырой клетчатки. Мышей содержали на облученных подстилках для лабораторных животных Envich-o'cobs™ в статических микроизоляторах с 12-часовым световым циклом при температуре 20–22°C (68–72°F) и влажности 40–60%.

**[00192]** Компания Celgene предоставила 5-азациитидин LEED, 5-азациитидин HELD (мидостаурин (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ), гилтеритиниб (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и венетоклак (ABT-199, Sigma Aldrich, Сент-Луис). Носитель, использованный в этом исследовании, представлял собой 6% Gelucire® 44/14 (Gattefossé, Paramus, NJ) в деионизированной (DI) воде, который представлял собой воскообразное твердое вещество, для плавления которого требовалось нагревание водяной бани до температуры 44°C, дозированно вводимый PO (перорально) и фосфатно-солевой буфер (PBS), дозированно вводимый IP (внутрибрюшинно). В каждый день дозированного введения соответствующее количество LEED или HELD 5-азациитидина ресуспендировали в PBS для получения дозированной суспензии с концентрацией 0,1 или 0,3 мг/мл, соответственно. В каждый день дозированного введения соответствующее количество мидостаурина растворяли в 6% Gelucire 44/14 с получением раствора для дозированного введения с концентрацией 10 мг/мл. В каждый день дозированного введения растворяли соответствующее количество гилтеритиниба в метилцеллюлозе с концентрацией 0,5% в деионизированной воде с получением раствора для дозированного введения с концентрацией 0,4 мг/мл. Каждую неделю соответствующее количество венетоклакса растворяли в 10% этанола: 30% ПЭГ400: 60% фозала 50 пропиленгликоля с получением дозируемого раствора с концентрацией 10 мг/мл. Клетки, используемые для инокуляции, собирали во время логарифмической фазы роста и ресуспендировали в концентрации  $5 \times 10^7$  клеток/мл в PBS. Каждой подопытной мыши вводили  $5 \times 10^6$  клеток MOLM-13 или  $10^7$  клеток MV4-11 (0,2 мл клеточной суспензии) путем инъекции в хвостовую вену. Введение дозы начинали через три дня после инокуляции опухолевых клеток, что было обозначено как день 1 исследования. Мышей NOD/SCID (n = 9-12 в группе) рандомизировали в соответствии с массой тела и дозами. Фосфатный буферный раствор, LEED 5-азациитидин и HELD 5-азациитидин вводили внутрибрюшинно (IP), тогда как мидостаурин, гилтеритиниб и венетоклак вводили перорально. Носитель вводили как IP, так и PO. Объем дозирования для всех обработок составлял 10 мл/кг в зависимости от массы каждого отдельного животного.

**[00193]** Животных индивидуально отслеживали на предмет конечной точки смерти из-за прогрессирования лейкоза. Полный паралич задних конечностей, тяжелый глазной экзофтальм или агония считались достаточными для эвтаназии из-за прогрессирования опухоли. Умиравшие животные определялись как больные животные, неспособные достать пищу и воду. Эти смерти классифицировали как смерть в исследовании выживаемости. Время до конечной точки (TTE) в днях регистрировали для каждой мыши, которая умерла от своего заболевания или была подвергнута эвтаназии из-за обширного прогрессирования опухоли. Животных, не достигших конечной точки, в конце исследования подвергали эвтаназии, и им присваивали значение TTE, равное последнему дню. Животному, классифицированному как умершее от причин, связанных с лечением (TR), присваивали значение TTE, равное дню смерти. Животное, классифицированное как умершее от причин, не связанных с лечением (NTR), или использованное для отбора проб до конечной точки, исключалось из расчетов TTE и всех дальнейших анализов. Среднее значение TTE рассчитывали для каждой группы. Медиана TTE обработанных мышей выражалась в процентах от медианы TTE контрольных мышей (%T/C), а увеличение продолжительности жизни (ILS) рассчитывалось как:  $ILS = \%T/C - 100\%$ , где T = медиана лечения TTE и C = медиана контроля TTE. Таким образом, если  $T = C$ ,  $ILS = 0\%$ .

**[00194]** Животных взвешивали ежедневно в дни 1-5, затем дважды в неделю до завершения исследования. За мышами часто наблюдали на предмет явных признаков каких-либо неблагоприятных побочных эффектов, связанных с лечением (TR), и при наблюдении регистрировали клинические признаки. Индивидуальную потерю массы тела контролировали в соответствии с протоколом, и любое животное, у которого превышались пределы допустимой потери массы тела, подвергали эвтаназии. Среднюю потерю массы тела в группе также контролировали в соответствии с протоколом. Дозированное введение приостанавливали в любой группе, которая превышала пределы приемлемой средней потери массы тела. Если средняя масса тела восстановилась, то можно было возобновить дозированное введение в этой группе, но в более низкой дозировке или с менее частым графиком дозированного введения. Приемлемую токсичность для максимально переносимой дозы определяли как среднегрупповую потерю массы тела менее чем 20% во время исследования и не более одной смерти TR среди десяти получавших лечение животных. Смерть классифицировали как TR, если она была связана с побочными эффектами лечения, о чем свидетельствуют клинические признаки и/или некропсия, или также может быть классифицирована как TR, если она была вызвана неизвестными причинами в течение периода дозирования или в течение 14 дней после последней дозы. Смерть классифицировали как NTR, если не было доказательств того, что смерть была

связана с побочными эффектами лечения или прогрессированием опухоли. Смертность, не связанную с лечением, можно дополнительно охарактеризовать на основе причины смерти. Смерть может быть классифицирована как NTRa, если она произошла в результате несчастного случая или человеческой ошибки. Смерть может быть классифицирована как NTRu, если причина смерти неизвестна и нет доступных доказательств смерти, связанной с побочными эффектами лечения, метастазами, несчастным случаем или человеческим фактором, хотя нельзя исключать смерть по этим причинам. Выживаемость анализировали по способу Каплана-Мейера на основе значений TTE. Логранговые тесты (Мантела-Кокса) и Гехана-Бреслоу-Уилкоксона определяли значимость различий между общим опытом выживания (кривыми выживания) двух групп на основе значений TTE.

*Результаты комбинаций 5-азацитидина с венетоклаксом*

**[00195]** На фиг. 1-7 представлена различная информация и данные относительно эксперимента. Например, фиг. 1 представляет собой гистограмму, представляющую максимальный кратный сдвиг  $EC_{50}$  для 5-азацитидина в комбинации с гилтеритинибом и 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином, как с клеточными линиями MV4-11, так и MOLM-13. Показаны результаты для трех различных схем дозированного введения: (i) 5-азацитидин, вводимый первым (черная полоса); (ii) одновременное введение двух средств (светло-серая полоса); и (iii) 5-азацитидин, вводимый вторым (средне-серая полоса). На фиг. 2 представлены три различных схемы дозированного введения: (i) 5-азацитидин (AZA), вводимый первым с интервалами до введения ингибитора FLT3 (FLT3i); (ii) два средства (5-азацитидин и FLT3i), вводимые одновременно; и (iii) 5-азацитидин, вводимый через определенные промежутки времени после введения FLT3i; причем FLT3i может представлять собой любой подходящий ингибитор FLT3, такой как мидостаурин или гилтеритиниб. На фиг. 3A-D представлен максимальный кратный сдвиг  $EC_{50}$  5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом с клеточными линиями MV4-11 (фиг. 3A) и MOLM-13 (фиг. 3C). Показаны три различные схемы дозированного введения: (i) 5-азацитидин, вводимый первым (черная полоса); (ii) одновременное введение двух средств (светло-серая полоса); и (iii) 5-азацитидин, вводимый вторым (средне-серая полоса). Также показан индекс синергизма для 5-азацитидина, вводимого в комбинации с венетоклаксом с клеточными линиями MV4-11 (фиг. 3B) и MOLM-13 (фиг. 3D) для трех различных схем дозированного введения.

**[00196]** На фиг. 4A-C представлен анализ поверхностей отклика, демонстрирующий синергизм 5-азацитидина с венетоклаксом в клетках MV4-11, когда 5-азацитидин вводят первым (фиг. 4A), относительно более низкий синергизм при одновременном введении (фиг. 4B) и синергизм с венетоклаксом, вводимым первым (фиг. 4C). Методология

поверхности отклика (RSM) исследует статистические взаимосвязи между несколькими независимыми переменными и одной или несколькими переменными отклика. RSM использует последовательность спланированных экспериментов для получения оптимального отклика, который в данном случае представляет собой синергический эффект 5-азациитидина с венетоклаксом.

**[00197]** На фиг. 5 представлен вестерн-блоттинг, показывающий, что (а) 5-азациитидин и мидостаурин («aza + 0,3 мкМ Mido») и (b) 5-азациитидин и гилтеритиниб («aza + 0,3 мкМ Gilt») усиливают деградацию MCL-1 в клеточных линиях MV4-11.

**[00198]** Кроме того, на фиг. 6 представлен вестерн-блоттинг, показывающий, что обработка 5-азациитидином и венетоклаксом снижает уровни MCL-1 в клетках FLT3ITD MV4-11.

**[00199]** Наконец, на фиг. 7A-C показаны оценки комбинаций 5-азациитидина *in vivo* в модели ксенотрансплантата MOLM-13 с графиком процентной выживаемости (ось Y) в зависимости от дня 0-70 (ось X). Дозированное введение для экспериментов, показанных на фиг. 7A-C был следующим: (i) 5-азациитидин (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность, LEED): 1 мг/кг внутривенно (IP), один раз в день в течение пяти дней, три раза (qd×5×3); (ii) 5-азациитидин (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность, HELD): 3 мг/кг внутривенно (IP), один раз в день в течение пяти дней (qd×5); (iii) мидостаурин (100 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)); (iv) гилтеритиниб (4 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)); и (v) венетоклак (100 мг/кг перорально (PO), один раз в день в течение двадцати одного дня (qd×21)). Р-значение (относительно лучшего отдельного средства) \*P<0,05; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001. На фиг. 7A показаны результаты комбинации 5-азациитидина и мидостаурина, на фиг. 7B показаны результаты для 5-азациитидина в комбинации с венетоклаксом, а на фиг. 7C показаны результаты комбинации 5-азациитидина и гилтеритиниба. Для фиг. 7A, испытанные композиции представляли собой носитель, 5-азациитидин (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность, LEED, схема приема 1 мг/кг 5-азациитидина один раз в день в течение пятнадцати дней (qd×15)), 5-азациитидин (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность, HELD, схема приема 3 мг/кг 5-азациитидина один раз в день в течение пяти дней (qd×5)), мидостаурин (100 мкг/кг, один раз в день в течение двадцати восьми дней (qd×28)), LEED + мидостаурин и HELD + мидостаурин. Для фиг. 7B, испытанные композиции представляли собой носитель, 5-азациитидин (LEED), 5-азациитидин (HELD), венетоклак, LEED + венетоклак и HELD + венетоклак. Для фиг. 7C, испытанные композиции представляли собой носитель, 5-азациитидин (LEED), 5-азациитидин (HELD), гилтеритиниб, LEED + гилтеритиниб и HELD +

гилтеритиниб. Как LEED, так и HELD дозировка 5-азациитидина вызывала статистически значимое увеличение выживаемости по сравнению с одним только носителем (LEED против носителя,  $p = 0,003$  по тесту Гехана-Бреслоу-Вилкоксона; HELD против носителя,  $p = 0,003$  по тесту Гехана-Бреслоу-Вилкоксона). Мидостаурин отдельно и в комбинации с LEED или HELD 5-азациитидином значительно увеличивал выживаемость по сравнению с одним носителем (мидостаурин против носителя,  $p = 0,027$ ; LEED + мидостаурин против носителя,  $p = 0,012$ ; HELD + мидостаурин против носителя,  $p = 0,003$ ). HELD 5-азациитидин в комбинации с мидостаурином значительно увеличивал выживаемость по сравнению с LEED или HELD 5-азациитидином, соответственно, (LEED + мидостаурин против LEED,  $p = 0,028$ ; HELD + мидостаурин против HELD,  $p = 0,039$ ). Никаких существенных изменений в выживаемости не наблюдалось между LEED или HELD в комбинации с мидостаурином по сравнению с лечением только мидостаурином. Медиана выживаемости была выше при использовании LEED или HELD 5-азациитидина в комбинации с мидостаурином по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + мидостаурин = 45 дней, HELD + мидостаурин = 43 дня, носитель = 19 дней, мидостаурин = 34 дня, LEED = 36 дней), HELD = 32 дня, (фиг. 7А). Гилтеритиниб отдельно и в комбинации с LEED или HELD 5-азациитидином значительно повышал выживаемость по сравнению с одним носителем (гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ; LEED + гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ; HELD + гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность или HELD дозировка 5-азациитидина в комбинации с гилтеритинибом значительно повышали выживаемость по сравнению либо с LEED, либо с HELD только с 5-азациитидином (LEED + гилтеритиниб против LEED,  $p = 0,019$ ; LEED + гилтеритиниб против HELD,  $p = 0,004$ ; HELD + гилтеритиниб против LEED,  $p = 0,008$ ; HELD + гилтеритиниб против HELD,  $p = 0,003$ ). Кроме того, LEED или HELD дозировка 5-азациитидина в комбинации с гилтеритинибом значительно повышала выживаемость по сравнению с монотерапией гилтеритинибом (LEED + гилтеритиниб против гилтеритиниба,  $p < 0,001$ ; HELD + гилтеритиниб против гилтеритиниба,  $p < 0,001$ ). Венетоклак сам по себе и в комбинации с LEED или HELD 5-азациитидином значительно повышал выживаемость по сравнению с одним носителем (венетоклак против носителя,  $p = 0,003$ ; LEED + венетоклак против носителя,  $p = 0,002$ ; HELD + венетоклак против носителя,  $p = 0,004$ ) (фиг. 7В). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность или HELD дозировка 5-азациитидина в комбинации с венетоклаком значительно повышала выживаемость по сравнению с LEED или HELD только 5-азациитидином (LEED + венетоклак против LEED,  $p = 0,001$ ; LEED + венетоклак против HELD,  $p < 0,001$ ; HELD + венетоклак против LEED,  $p = < 0,001$ ; HELD + венетоклак против HELD,  $p = < 0,001$ ). Кроме того, применение LEED

или HELD 5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом значительно увеличивало выживаемость по сравнению с монотерапией венетоклаксом (LEED + венетоклаксом против венетоклакса,  $p < 0,001$ ; HELD + венетоклаксом против венетоклакса,  $p < 0,001$ ). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность в комбинации с венетоклаксом существенно не отличались от HELD в комбинации с венетоклаксом. Медиана выживаемости была выше при LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + венетоклаксом = 46 дней, HELD + венетоклаксом = 45 дней, носитель = 19 дней, венетоклаксом = 29 дней, LEED = 36 дней, HELD = 32 дня). Медиана выживаемости была выше при LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с гилтеритинибом по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + гилтеритиниб = 45 дней, HELD + гилтеритиниб = 43 дня, носитель = 19 дней, гилтеритиниб = 34 дня, LEED = 36 дней, HELD = 32 дня (фиг. 7C).

**[00200]** На фиг. 8A, 8B и 8C показана чувствительность 22 клеточных линий AML к 5-азацитидину (AZA) и венетоклаксу как к отдельным средствам, так и к комбинации 5-азацитидина и венетоклакса. На фиг. 8A показано, что 5-азацитидин проявлял цитотоксические эффекты в большинстве клеточных линий со значениями  $EC_{50}$  в диапазоне от 0,15 мкМ до 2,5 мкМ. Напротив, на фиг. 8B показано, что 11/22 исследованных клеточных линий AML были чувствительны к венетоклаксу ( $EC_{50} < 10$  мкМ). На фиг. 8C показана комбинаторная активность 5-азацитидина с венетоклаксом с использованием анализа поверхностного отклика и модели «Наиболее эффективного отдельного средства», где 10/22 клеточных линий продемонстрировали синергетическую активность выше условного порога 20. Примечательно, что три клеточные линии, устойчивые к венетоклаксу (Kasumi-1, Kasumi-2 и НОМО-1), показали изменение устойчивости к венетоклаксу при совместной обработке 5-азацитидином. Клеточные линии, несущие FLT3-ITD, рецидивирующую мутацию при AML, также проявляли синергическую активность с 5-азацитидином и венетоклаксом.

**[00201]** Эти результаты неожиданно демонстрируют, что комбинация 5-азацитидина с венетоклаксом обеспечивает синергический эффект в клеточных линиях AML и, в частности, в клеточных линиях AML, устойчивых к венетоклаксу.

**[00202]** Также исследовали влияние конкретной схемы введения 5-азацитидина и венетоклакса на синергический эффект, обеспечиваемый 5-азацитидином и венетоклаксом. На фиг. 9A-F показана выживаемость клеток MV4-11 (фиг. 9A-C) и клеток MOLM-13 (фиг. 9D-F) после начала лечения 5-азацитидином и венетоклаксом. Исследовали следующие схемы: введение 5-азацитидина в дни 1, 2 и 3 с последующим введением венетоклакса в день 4 (первый 5-азацитидин (AZA)) (фиг. 9A и 9D); одновременное введение 5-

азациитидина и венетоклакса в день 1 с последующим введением 5-азациитидина в дни 2 и 3 (одновременно) (фиг. 9В и 9Е); и введение венетоклакса в день 1 с последующим введением 5-азациитидина в дни 2, 3 и 4 (первый венетоклак) (фиг. 9С и 9F). Как отражено показанными индексами синергизма (SI), результаты показывают, что для обеих клеточных линий схема, при которой 5-азациитидин вводили первым, обеспечивала максимальный синергетический эффект. Эти результаты позволяют предположить, что 5-азациитидин может стимулировать клетки АМЛ к активности венетоклакса.

**[00203]** Одним из факторов устойчивости к венетоклаксу является экспрессия регулятора апоптоза MCL-1, экспрессия которого повышается при АМЛ с мутацией FLT3 и снижается после лечения 5-азациитидином. Чтобы выяснить, коррелируют ли уровни MCL-1 со степенью синергетического эффекта комбинации 5-азациитидина-венетоклакса, исследовали панель сконструированных клеточных линий BaF3, экспрессирующих мутации FLT3 дикого типа, FLT3-ITD или FLT3 (D835Y). Сконструированные клеточные линии BaF3 также пролиферировали независимо от IL-3. На фиг. 10А показано, что эти сконструированные клеточные линии BaF3 были устойчивы к венетоклаксу ( $EC_{50} > 1 \text{ мкМ}$ ), но чувствительны к ингибиторам FLT3, таким как гилтеритиниб, мидостаурин и квизартиниб. Данные, показанные на фиг. 10А также показан в таблице 1 ниже.

**Таблица 1. Клетки BaF3, экспрессирующие различные FLT3 ( $EC_{50}$ , нМ)**

	BaF-FLT3(WT)	BaF-FLT3-ITD	BaF-FLT3(D835Y)
AZA	189	598	456
Гилтеритиниб	4	1,8	1,8
Мидостаурин	23	5,5	5,4
Квизартиниб	3	0,008	9,5
Венетоклак	>10000	>10000	4332

**[00204]** На фиг. 10В показано, что MCL-1 был обнаружен во всех линиях, при этом самые высокие уровни экспрессии наблюдались в мутантной линии FLT-ITD, за которой следовал FLT3 (D835Y). Комбинация 5-азациитидина с венетоклаксом продемонстрировала синергетический эффект, при этом самый высокий индекс синергизма наблюдался у FLT3 (дикий тип), экспрессирующих самые низкие уровни MCL-1, за которыми следуют FLT3 (D835Y) (промежуточные уровни MCL-1) и FLT3-ITD (самый высокий MCL-1) (фиг. 10С). Эти результаты позволяют предположить, что экспрессия MCL-1 может быть определяющим фактором синергизма 5-азациитидина-венетоклакса.

**[00205]** Для дальнейшего изучения взаимосвязи между MCL-1 и синергизмом 5-азациитидина-венетоклакса исследовали взаимосвязь между уровнями РНК *MCL1* и показателями синергизма 5-азациитидина-венетоклакса на панели из 20 клеточных линий AML. На фиг. 11 показано, что уровни РНК *MCL1* прямо коррелировали с индексом синергизма ( $r^2 = -0,5607$ ,  $p = 0,0101$ ) на панели из 20 клеточных линий AML. Эти результаты показывают, что MCL-1 может быть ключевым регулятором праймирования AZA для индуцированного венетоклаксом апоптоза, в частности, 5-азациитидин может снижать MCL-1 ниже определенного порога, чтобы сделать возможным апоптоз, опосредованный венетоклаксом.

**[00206]** Затем исследовали степень опосредованной 5-азациитидином деградации MCL-1 в четырех различных клеточных линиях AML KG1 $\alpha$  (фиг. 12A), MV4-11 (фиг. 12B), THP-1 (фиг. 12C) и OCI-AML-2 (фиг. 12D). Результаты показали синергетическую активность 5-азациитидина-венетоклакса с клеточными линиями KG1  $\alpha$  (фиг. 12E) и MV4-11 (фиг. 12F) (индекс синергизма (SI) 70 и 35,5, соответственно) и очень небольшую синергетическую активность или ее отсутствие с клеточными линиями THP-1 (фиг. 12G) и OCI-AML-2 (фиг. 12H) (SI 20,2 и 10,8, соответственно). Для клеточных линий KG1  $\alpha$  (фиг. 12A) и MV4-11 (фиг. 12B), где 5-азациитидин-венетоклакс оказывал наибольший синергетический эффект (фиг. 12E и 12F), 5-азациитидин приводил к самой быстрой деградации MCL-1, начиная с 6 часов после обработки. Напротив, для THP-1 (фиг. 12C), где 5-азациитидин-венетоклакс обеспечивал лишь незначительную синергетическую активность, опосредованная 5-азациитидином деградация MCL-1 наблюдалась позже, начиная с 16 часов, с неполным расщеплением через 24 часа (фиг. 12G). Для OCI-AML2 (фиг. 12D), где 5-азациитидин-венетоклакс имеет самый низкий синергетический эффект (фиг. 12H), обработка 5-азациитидином не приводила к какой-либо деградации MCL-1. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что 5-азациитидин стимулирует клетки к апоптозу, опосредованному венетоклаксом, путем снижения уровня MCL-1.

**[00207]** Один возможный механизм, с помощью которого 5-азациитидин подавляет MCL-1, заключается в индукции активации каспазы. Активацию каспазы можно оценить путем оценки деградации каспазы 3 в вестерн-блоттинге (фиг. 13A). Чтобы выяснить, является ли этот эффект зависимым от каспаз, клетки обрабатывали Z-VAD-FMK, ингибитором ран-каспаз, и измеряли степень деградации MCL-1 под действием 5-азациитидина (фиг. 13B). В частности, на фиг. 13B показана гистограмма деградации MCL-1 5-азациитидином, где клетки обрабатывали 20 мкМ Z-VAD-FMK в течение 1 часа перед обработкой 5-азациитидином в течение еще 16 часов. Ингибирование каспазы частично устраняло деградацию MCL-1 под действием 5-азациитидина в клетках MV4-11, что

указывает на дополнительные, независимые от каспазы механизмы деградации MCL-1. Было обнаружено, что Z-VAD-FMK частично устраняет способность 5-азациитидина расщеплять MCL-1, предполагая, что этот процесс опосредован зависимыми и не зависимыми от каспаз механизмами.

**[00208]** Чтобы лучше понять, как 5-азациитидин активирует венетоклак в отношении острого апоптоза, RNAseq выполняли на клетках MV4-11, обработанных PBS (носитель), 1 мкМ AZA в течение 24 часов (фиг. 14A) или 1 мкМ AZA в течение 48 часов (фиг. 14B). Таблица 2 представляет собой анализ путей для данных RNASeq на фиг. 14A и показывает анализ после обработки 5-азациитидином, который представляет собой классификацию генов, которые в значительной степени индуцируются или репрессируются 5-азациитидином, на основе путей KEGG.

**Таблица 2. Значимые пути Kegg через 24 часа (отсутствие значимости через 48 часов)**

Путь	Среднее LogFC	p-значение	Скорректир. p-значение
Рибосома	-10,50	10,49547	5,44E-21
Окислительное фосфорилирование	-7,32	7,315598	2,01E-12
Метаболические пути	-5,79	5,788892	4,06E-09
Клеточный цикл	-5,75	5,746475	1,43E-08
Процессинг белков в эндоплазматическом ретикулуме	-4,96	4,958095	6,26E-07
Репликация ДНК	-4,45	4,450573	1,83E-05
Протеасома	-4,41	4,410196	2,17E-05
Фагосома	-4,13	4,134259	2,49E-05
Сплайосома	-4,10	4,100521	2,90E-05
Некроптоз	-3,78	3,779974	9,92E-05
Метаболизм жирных кислот	-3,43	3,425249	4,51E-04
Процессинг и презентация антигена	-3,39	3,393502	5,02E-04
Углеродный обмен	-3,35	3,354515	4,75E-04
Биосинтез ненасыщенных жирных кислот	-3,26	3,260586	1,11E-03
Экспорт белка	-3,19	3,191372	1,46E-03
Транспорт РНК	-3,08	3,081532	1,15E-03
Репарация ошибок спаривания	-2,98	2,975621	2,43E-03
Удлинение жирных кислот	-2,87	2,867612	3,26E-03
Лизосома	-2,82	2,816478	2,65E-03
Клеточное старение	-2,69	2,691944	3,78E-03
Сокращение сердечной мышцы	-2,61	2,614268	5,21E-03
Биосинтез терпеноидного остова	-2,48	2,481832	9,05E-03
Регуляция актинового цитоскелета	-2,46	2,456262	7,30E-03
Вкусовая трансдукция	2,44	2,436918	8,81E-03
Сигнальные пути p53	-2,42	2,419681	8,46E-03

**[00209]** Никаких существенных различий в путях KEGG, регулируемых 5-азациитидином, не наблюдалось после 48 часов лечения. Однако основными путями KEGG, дифференциально регулируемые после 24 часов лечения 5-азациитидином, были «рибосома», «окислительное фосфорилирование», «метаболические пути» и «клеточный цикл». Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что 5-азациитидин играет роль в изменении клеточного метаболизма, вызывая остановку клеточного цикла, подавляя окислительное фосфорилирование, что ранее наблюдалось у пациентов, получавших комбинацию 5-азациитидин+венетоклакс.

**[00210]** Вулканные диаграммы значительно модифицированных генов через 24 часа (фиг. 14A) и 48 часов (фиг. 14B) показывают, что 5-азациитидин индуцирует 133 дифференциально экспрессируемых гена через 24 часа и 226 дифференциально экспрессируемых генов через 48 часов. При дальнейшем анализе дифференциально экспрессируемых генов, индуцированных 5-азациитидином, были идентифицированы два гена, которые, как было показано ранее, регулируют экспрессию MCL1: активирующий транскрипционный фактор 3 (ATF3) и стеароил-КоА-десатуразу (SCD). ATF3 представляет собой чувствительный к стрессу фактор транскрипции, который, как было показано, регулирует MCL-1, а также иммунные и метаболические гены. Экспрессия ATF3 увеличивалась в два раза через 48 часов после обработки 5-азациитидином. С другой стороны, экспрессия SCD, регулятора метаболизма липидов и MCL1, снижалась в 2,5 раза при обработке 5-азациитидином через 48 часов. Изменения в экспрессии ATF3 (фиг. 14C) и SCD (фиг. 14D) были подтверждены в отдельном эксперименте с использованием ПЦР в реальном времени. Экспрессия ATF3 увеличивалась в зависимости от времени и концентрации, поскольку обработка 0,3 мкМ 5-азациитидином была недостаточной для индукции экспрессии ATF3 ни через 24, ни через 48 часов (фиг. 14C). Точно так же экспрессия SCD быстро снижалась в течение 24 часов при обработке 3 мкМ 5-азациитидином, хотя в этот момент на нее не влияли низкие концентрации 5-азациитидина (фиг. 14D).

**[00211]** Учитывая их связь с регуляцией экспрессии MCL1, было высказано предположение, что ATF3 и/или SCD могут способствовать синергизму 5-азациитидина-венетоклакса. Для дальнейшего изучения этого использовали нокдаун siRNA этих генов в клетках MV4-11 для оценки их функции в синергизме. Клетки MV4-11 оставляли нетрансфицированными или трансфицировали ATF3, SCD или контрольной (скремблированной) siRNA. В качестве контроля клетки трансфицировали siRNA и собирали для РНК и количественной ПЦР через 72 часа после трансфекции (фиг. 15A). Это подтвердило, что нокдаун siRNA снижал, но не полностью устранял экспрессию мРНК

ATF3 или SCD, когда клетки трансфицировали siRNA ATF3 или SCD, соответственно. Кроме того, в клетках, обработанных скремблированной siRNA, не наблюдалось изменений в экспрессии ATF3 (фиг. 15B) или SCD (фиг. 15C). После трансфекции клетки обрабатывали различными концентрациями 5-азацитина ежедневно в течение 1-3 дней. В день 4 в клетки вводили венетоклак с последующим тестом на жизнеспособность клеток с использованием CellTiter-Glo® 7 после начала лечения. Синергизм 5-азацитина-венетоклакса рассчитывали с использованием анализа CombeneFit и Highest Single Agent (фиг. 15D-G). Синергизм 5-азацитина-венетоклакса был подтвержден в клетках, которые не были трансфицированы (индекс синергизма = 43) (фиг. 15D), и на синергизм не влияла сама трансфекция, поскольку клетки, трансфицированные скремблированной siRNA (фиг. 15E), имели индекс синергизма 46. Когда ATF3 подвергли нокдауну (фиг. 15F), 5-азацитин-венетоклак проявлял сниженный синергизм (индекс синергизма = 19). С другой стороны, при нокдауне SCD (фиг. 15G) 5-азацитин-венетоклак проявлял повышенный синергизм (индекс синергизма = 60). Эти данные свидетельствуют о том, что вызванное 5-азацитином увеличение ATF3 и снижение SCD играют, по меньшей мере, частичную роль в синергизме 5-азацитина-венетоклакса.

**[00212]** Затем оценивали, обладают ли 5-азацитин и венетоклак синергетической активностью *in vivo* в дозах и схемах, соответствующих инъекционному 5-азацитину (HELD) или пероральному 5-азацитину (LEED). MV4-11 (фиг. 16A-C) и MOLM-13 (фиг. 16D-F), две клеточные линии, демонстрирующие синергизм 5-азацитина-венетоклакса (фиг. 8C), использовали для получения мышей с диссеминированным ксенотрансплантатом AML у животных с иммунодефицитом. *In vitro* венетоклак повышал чувствительность обеих клеточных линий к венетоклаксу (фиг. 16A и 16D) и проявлял синергизм с 5-азацитином (фиг. 16B и 16E). Для моделирования пероральных схем введения 5-азацитина (LEED) мышей лечили 1 мг/кг 5-азацитина в течение 15 дней (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность). В качестве альтернативы, чтобы использовать ту же кумулятивную дозу, но с инъекционной схемой 5-азацитина (HELD), мышей лечили 3 мг/мл 5-азацитина в течение 5 дней (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность).

**[00213]** Для имплантации MV4-11 самкам мышей NCG вводили через хвостовую вену  $1 \times 10^7$  клеток в 0,2 мл клеточной суспензии. День 1 был обозначен как четырнадцать дней после имплантации. В день 1 мышей разделили на группы лечения в зависимости от массы тела, и дозированное введение начинали следующим образом: мыши, получавшие носитель, высокая доза 5-азацитина (HELD, 3 мг/кг один раз в день в течение пяти дней (qd×5)), низкая доза 5-азацитина (LEED, 1 мг/кг один раз в день в течение пяти дней, три

раза ( $qd \times 5 \times 3$ )), венетоклак (100 мг/кг,  $qd \times 21$ ), HELD+венетоклак или LEED+венетоклак. За мышами наблюдали в отношении потери массы тела и агонии в течение 56 дней после первоначального лечения, чтобы определить, когда мыши умирали от опухолевого бремени. Венетоклак отдельно или в комбинации с LEED или HELD 5-азацитидином значительно увеличивал выживаемость по сравнению с одним носителем (венетоклак против носителя,  $p = 0,0493$ ; LEED + венетоклак против носителя,  $p = 0,0123$ ; HELD + венетоклак против носителя,  $p = 0,04$ ). LEED или HELD 5-азацитидин в комбинации с венетоклаксом значительно повышал выживаемость по сравнению с монотерапией 5-азацитидином (LEED + венетоклак против LEED,  $p = 0,001$ ; HELD + венетоклак против HELD,  $p = 0,0004$ ). Однако только LEED + 5-азацитидин был значительно лучше, чем только венетоклак (LEED + венетоклак против венетоклакса,  $p = 0,0378$ ). Кроме того, комбинация LEED или HELD 5-азацитидина с венетоклаксом увеличивала медиану выживаемости по сравнению с монотерапией (LEED + венетоклак = 38, HELD + венетоклак = 37, носитель = 29,5, HELD = 35, LEED = 35, венетоклак = 35,5) (фиг. 16C).

**[00214]** Эти эксперименты повторяли со второй клеточной линией FLT3-ITD, MOLM-13. Вкратце,  $5 \times 10^6$  клеток MOLM-13 вводили 12 мышам NOD/SCI на группу. Через три дня после инокуляции опухолевых клеток мышей лечили той же схемой дозированного введения, что и клетки MV4-11. За мышами наблюдали в отношении потери массы тела и агонии в течение 70 дней после первоначального лечения, чтобы определить, когда мыши умирали от бремени заболевания. Венетоклак сам по себе и в сочетании с LEED или HELD 5-азацитидином значительно повышал выживаемость по сравнению с монотерапией (венетоклак против носителя,  $p = 0,003$ ; LEED + венетоклак против носителя,  $p = 0,002$ ; HELD + венетоклак против носителя,  $p = 0,004$ ). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность или HELD дозировка 5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом значительно повышала выживаемость по сравнению только с 5-азацитидином LEED или HELD (LEED + венетоклак против LEED,  $p = 0,001$ ; LEED + венетоклак против HELD,  $p < 0,001$ ; HELD + венетоклак против LEED,  $p < 0,001$ ; HELD + венетоклак против HELD,  $p < 0,001$ ). Кроме того, применение LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом значительно увеличивало выживаемость по сравнению с монотерапией венетоклаксом (LEED + венетоклак против венетоклакса,  $p < 0,001$ ; HELD + венетоклак против венетоклакса,  $p < 0,001$ ). Медиана выживаемости была выше при LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с венетоклаксом по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + венетоклак = 46 дней, HELD + венетоклак = 45 дней, носитель = 19 дней, венетоклак = 29 дней, LEED = 36 дней, HELD = 32 дня (фиг. 16F).

**[00215]** В целом, эти результаты показывают, что субъекты с мутациями FLT3-ITD могут получить пользу от комбинированной терапии AZA+Ven.

*Результаты комбинаций 5-азациитидина с ингибиторами FLT-3*

**[00216]** Мутации FLT3 встречаются около у 30% пациентов с AML и связаны с неблагоприятным прогнозом. Ингибитор FLT-3 широкого действия мидостаурин и селективный ингибитор FLT3 гилтеритиниб одобрены для лечения AML. Чтобы выяснить, оказывает ли совместное лечение 5-азациитидином и ингибиторами FLT3 синергический эффект на клетки AML, две клеточные линии FLT3-ITD, клетки MV4-11 и MOLM-13, обрабатывали 5-азациитидином + мидостаурином или 5-азациитидином + гилтеритинибом. Клетки обрабатывали ежедневными дозами 5-азациитидина в день 1-3, а затем обрабатывали ингибитором FLT-3 (мидостаурином или гилтеритинибом) в день 4. Клетки собирали в день 7, и жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа CellTiter-Glo®. Мидостаурин повышал чувствительность MV4-11 к 5-азациитидину (фиг. 17A) и проявлял синергическую активность с 5-азациитидином (фиг. 17B). Подобные эффекты наблюдались в клетках MV4-11, обработанных 5-азациитидином и гилтеритинибом (фиг. 17C и 17D), а также в клетках MOLM-13, обработанных 5-азациитидином и мидостаурином (фиг. 17E и 17F) или гилтеритинибом (фиг. 17G и 17H).

**[00217]** Затем исследовали синергическую активность между ингибиторами FLT3 и 5-азациитидином, вводимым с использованием дозы и схемы, аналогичной инъекционному (высокая экспозиция, ограниченная продолжительность, или схема HELD) или пероральному (низкая экспозиция, увеличенная продолжительность, LEED). Использовали две диссеминированные ксенотрансплантатные модели AML на основе клеточных линий MOLM-13 и MV4-11. Мышей лечили 5-азациитидином по схеме HELD (3 мг/кг, ежедневно в течение 5 дней) или LEED (1 мг/кг, один раз в день в течение пятнадцати дней (qd×15)). Ингибиторы FLT3 мидостаурин в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 21 дня и гилтеритиниб в дозе 4 мг/кг, qd×21 вводили в виде отдельных средств или в схемах HELD или LEED с 5-азациитидином. В моделях ксенотрансплантата MOLM-13 мидостаурин отдельно и в комбинации с LEED или HELD 5-азациитидином значительно увеличивал выживаемость по сравнению с одним носителем (мидостаурин против носителя,  $p = 0,027$ ; LEED + мидостаурин против носителя,  $p = 0,012$ ; HELD + мидостаурин против носителя,  $p = 0,003$ ) (фиг. 17I). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность или HELD дозировка 5-азациитидина в комбинации с мидостаурином значительно повышала выживаемость по сравнению с LEED или HELD 5-азациитидином, соответственно (LEED + мидостаурин против LEED,  $p = 0,028$ ; HELD + мидостаурин против HELD,  $p = 0,039$ ). Никаких существенных изменений в выживаемости не наблюдалось между LEED или

HELD в комбинации с мидостаурином по сравнению с лечением только мидостаурином. Медиана выживаемости была выше при использовании LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + мидостаурин = 45 дней, HELD + мидостаурин = 43 дня, носитель = 19 дней, мидостаурин = 34 дня, LEED = 36 дней, HELD = 32 дня) (фиг. 17I).

**[00218]** В моделях ксенотрансплантата MV4-11 мидостаурин отдельно и в комбинации с LEED или HELD 5-азацитидином увеличивал выживаемость по сравнению с одним носителем (мидостаурин против носителя,  $p = 0,0067$ ; LEED + мидостаурин против носителя,  $p = 0,0084$ ; HELD + мидостаурин против носителя,  $p = 0,0625$ ). LEED или HELD дозирование 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином значительно увеличивало выживаемость по сравнению только с LEED или HELD 5-азацитидина (LEED + мидостаурин против LEED,  $p = <0,0001$ ; HELD + мидостаурин против HELD,  $p = 0,0015$ ). Кроме того, LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином не увеличивали значительно выживаемость по сравнению с одним мидостаурином (LEED + мидостаурин против мидостаурина,  $p = 0,1704$ ; HELD + мидостаурин против мидостаурина,  $p = 0,8308$ ). Медиана выживаемости была выше при использовании LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с мидостаурином по сравнению с носителем или отдельными средствами HELD или LEED (LEED + мидостаурин = 64,5, HELD + мидостаурин = 59,5, носитель = 29,5, LEED = 35, HELD = 35, мидостаурин = 57) (фиг. 17J).

**[00219]** В моделях ксенотрансплантата MOLM-13 гилтеритиниб отдельно и в комбинации с LEED или HELD 5-азацитидином значительно увеличивал выживаемость по сравнению с одним носителем (гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ; LEED + гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ; HELD + гилтеритиниб против носителя,  $p = 0,003$ ). Низкая экспозиция, увеличенная продолжительность или HELD дозировка 5-азацитидина в комбинации с гилтеритинибом значительно повышала выживаемость по сравнению либо только с LEED, либо с HELD 5-азацитидином (LEED + гилтеритиниб против LEED,  $p = 0,019$ ; LEED + гилтеритиниб против HELD,  $p = 0,004$ ; HELD + гилтеритиниб против LEED,  $p = 0,008$ ; HELD + гилтеритиниб против HELD,  $p = 0,003$ . HELD + гилтеритиниб против гилтеритиниба,  $p < 0,001$ ) Медиана выживаемости была выше при LEED или HELD 5-азацитидина в комбинации с гилтеритинибом по сравнению с носителем или монопрепаратами (LEED + гилтеритиниб = 45 дней, HELD + гилтеритиниб = 43 дня, носитель = 19 дней, гилтеритиниб = 34 дня, LEED = 36 дней, HELD = 32 дня) (фиг. 17K).

**[00220]** В целом эти результаты свидетельствуют о том, что LEED или HELD 5-азацитидин в комбинации с ингибитором FLT3 значительно более эффективен в

уничтожении клеток AML по сравнению с одним средством 5-азациитидином или только ингибитором FLT3.

*Тройной комбинированный анализ 5-азациитидин/венетоклак/CC-90011*

**[00221]** Как используется в следующем примере, CC-90011 относится к 4-[2-(4-амино-пиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метокси-фенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрилу, включая в себя безилатную соль.

**[00222]** CC-90011 (30 мМ в ДМСО) получали из банка коллекций соединений Celgene, разбавляли ДМСО до 10 мМ маточного раствора, разделяли на аликвоты и хранили при температуре -80°C. Клеточные линии AML высевали по 2000 клеток на лунку в 384-луночные планшеты, а затем обрабатывали в формате матрицы 6 концентрациями CC-90011 в день 0 и 9 концентрациями смеси 5-азациитидина и венетоклакса в соотношении, соответствующем таковой EC<sub>50</sub> для каждого соединения. 5-азациитидин вводили ежедневно в дни 1, 2 и 3, а венетоклак вводили в день 4. Впоследствии жизнеспособность клеток определяли с использованием реагента CellTiter-Glo® в соответствии с инструкциями производителя (Promega Inc.). Эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>), вызывающую 50% гибель клеток, определяли с помощью алгоритмов нелинейной регрессии с использованием Prism 7.03 (программное обеспечение GraphPad). Индекс синергизма и трехмерный график анализировали с помощью программного обеспечения Combenefit (Di Veroli Bioinformatics 2016) с использованием модели Highest Single Agent.

*Результаты комбинации 5-азациитидина, венетоклакса и CC-90011*

**[00223]** Эффективность CC-90011, AZA и венетоклакса в качестве лечения одним средством для индуцирования цитотоксичности оценивали на 22 клеточных линиях AML (фиг. 18A). Одиннадцать из этих линий были чувствительны к CC-90011, из которых 8 линий были чувствительны к CC-90011, AZA и венетоклаксу, а 3 клеточные линии были чувствительны к AZA и CC-90011, но не к венетоклаксу (EC<sub>50</sub> выше максимальной концентрации используемого венетоклакса, 10 мкМ). Четыре клеточные линии были чувствительны к AZA и венетоклаксу, но устойчивы к CC-90011 (EC<sub>50</sub> > 10 мкМ), в то время как 7 клеточных линий были устойчивы как к венетоклаксу, так и к CC-90011 (фиг. 18A).

**[00224]** Ингибиторы LSD усиливают дифференцировку в нескольких клеточных линиях AML и в моделях ксенотрансплантатов AML человека (фиг. 18B). Чтобы исследовать индукцию маркеров дифференцировки с помощью CC-90011, использовали проточную цитометрию для измерения экспрессии поверхностных маркеров CD11b, CD14 и CD86 в 22 клеточных линиях AML после обработки CC-90011. Семнадцать из этих клеточных линий увеличивали экспрессию по меньшей мере одного из этих маркеров дифференцировки, в то время как пять клеточных линий не имели изменений ни в одном из

этих маркеров дифференцировки, включая в себя HEL, KG-1, MOLM-13, KG-1a и NOMO-1 (фиг. 18B). Следует отметить, что повышенная экспрессия маркеров дифференцировки не коррелировала с чувствительностью к цитотоксичности CC-90011.

**[00225]** Чтобы изучить, проявляет ли тройная комбинация AZA+Ven+CC-90011 синергизм в клеточных линиях AML, 13 из 22 клеточных линий AML обрабатывали различными концентрациями AZA+Ven+CC-90011 (фиг. 18C и 19A-M). После 7 дней обработки жизнеспособность клеток исследовали с помощью CellTiter-Glo®, синергизм рассчитывали с помощью Combenefit и картировали поверхность с использованием моделирования «Наиболее эффективного отдельного средства» (фиг. 19A-M). Клеточные линии AML, обработанные AZA+Ven+ CC-90011, характеризовались различной степенью синергизма, так как MUTZ-8 и OCI-AML3 характеризовались чрезвычайно высоким синергизмом (оценка индекса синергизма 115 и 112, соответственно). Напротив, GDM-1 и Kasumi-1 практически не имели синергизма (индекс синергизма 6 и 15, соответственно). Клеточные линии, устойчивые к единственному средству венетоклаксу или CC-90011 (SIG-M5, MOLM-13, HNT-34, OCI-AML3 и THP-1), реагировали на тройную комбинацию AZA+Ven+CC-90011. Это говорит о том, что тройная комбинация AZA+Ven+CC-90011 может быть эффективной у пациентов с AML, даже если эти пациенты изначально были резистентны к венетоклаксу или CC-90011.

**[00226]** Чтобы определить, была ли тройная комбинация AZA+Ven+CC-90011 более эффективной по сравнению с AZA+CC-90011 или Ven+CC-90011, тройную комбинацию сравнивали с парными комбинациями этих средств (фиг. 20A-D). В OCI-AML-2 двойные комбинации AZA+CC-90011 (фиг. 20A), Ven+ CC-90011 (фиг. 20B) или AZA+Ven (фиг. 20C) не проявляли синергизма в клетках OCI-AML2. Однако когда OCI-AML2 обрабатывают комбинацией AZA+Ven+CC-90011 (фиг. 20D), синергизм существенно увеличивался.

**[00227]** Это демонстрирует, что тройная комбинация лучше уничтожает лейкемические клетки, чем отдельные средства по отдельности или в любой двойной комбинации в клетках OCI-AML2.

## **Пример 2**

**[00228]** Как используется в следующем примере, CC-90011 относится к безилатной соли 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрила.

**[00229]** **Цели исследования:** Иллюстративная цель исследования заключается в оценке безопасности и переносимости CC-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-

азациитидином у ранее не получавших лечения субъектов с AML, которым не подходит интенсивная индукция.

**[00230]** Дополнительная цель включает в себя: (1) оценку предварительной эффективности CC-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином у ранее не получавших лечения субъектов с AML, которым не показана интенсивная индукционная химиотерапия; и (2) оценку частоты ответа на минимальную остаточную болезнь (MRD) и скорость конверсии MRD с помощью многоцветной проточной цитометрии (MFC) и/или секвенирования следующего поколения (NGS).

**[00231]** Дополнительные цели включают в себя: (1) изучение продолжительности ответа MRD путем оценки аспирации костного мозга и исследования мазков периферической крови; (2) характеристику фармакокинетического профиля CC-90011 при введении в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (3) характеристику PD, чтобы понять механистические эффекты CC-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (4) изучение взаимосвязи между биомаркерами PK, PD и/или клиническими исходами CC-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; (5) оценку молекулярных и/или клеточных маркеров в костном мозге и крови, которые коррелируют с эффективностью CC-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином; и (6) оценку степени независимости CC-90011 от трансфузии после исходного уровня в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином.

**[00232]** Конечные точки исследования показаны ниже в Таблице 3.

<b>Таблица 3: Конечные точки исследования</b>			
<b>Конечная точка</b>	<b>Название</b>	<b>Описание</b>	<b>Период времени</b>
Первичная	Безопасность и переносимость	Нежелательные явления (с использованием версии 5.0 NCI CTCAE), лабораторные тесты, основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, состояние работоспособности по шкале ECOG, фракция выброса левого желудочка, медицинские осмотры, сопутствующие лекарственные средства и модификации доз.	От подписи ICF до 28 дней после последней дозы CC-90011
	RP2D	DLT и MTD (если достигнуты) оценивают с использованием критериев NCI CTCAE, версия 5.0.	От C1D1 до конца цикла 1 в части повышения дозы

<b>Таблица 3: Конечные точки исследования</b>			
<b>Конечная точка</b>	<b>Название</b>	<b>Описание</b>	<b>Период времени</b>
Вторичная	Предварительная эффективность	Частота CR/CRh: определяется как частота достижения CR или CRh (по оценке исследователя).	От C1D1 до 28 дней после последней дозы. Оценки эффективности будут проводиться в день 1 циклов 2, 3, 4, а затем каждые 2 цикла (например, цикл 6, 8, 10 и т.д.).
		ORR: определяется как частота достижения CR/CRR <sub>MRD</sub> -/CRi/PR/MLFS	От C1D1 до 28 дней после последней дозы. Оценки эффективности будут проводиться в день 1 циклов 2, 3, 4, а затем каждые 2 цикла (например, цикл 6, 8, 10 и т.д.).
		DOR (CR/CRh)	Со времени от первого CR или CRh до даты зарегистрированного рецидива заболевания или смерти, в зависимости от того, что наступит раньше.
		DOR (CR/ CR <sub>MRD</sub> -/CRi/PR/MLFS)	Со времени от первого CR, CR <sub>MRD</sub> -, CRi, PR или MLFS до даты задокументированного рецидива заболевания, прогрессирования или смерти, в зависимости от того, что наступит раньше.
Вторичная (продолженная)	Предварительная эффективность	EFS	От первой дозы CC-90011 до первого случая рецидива или прогрессирования или смерти по любой причине. Субъекты, у которых нет рецидива/прогресса или смерти на дату прекращения сбора данных, будут подвергнуты цензурированию на дату их последней адекватной оценки опухоли.

<b>Таблица 3: Конечные точки исследования</b>			
<b>Конечная точка</b>	<b>Название</b>	<b>Описание</b>	<b>Период времени</b>
		OS	От первой дозы СС-90011 до даты смерти по любой причине. Субъекты, которые живы на момент прекращения анализа, будут подвергнуты цензурированию на дату последнего контакта.
	Частота ответов MRD	Частота снижения бремени заболевания по меньшей мере на один логарифм или отрицательный результат теста на MRD ( $10^{-3}$ )	Оценки MRD будут проводиться при скрининге, в день 1 циклов 2, 3, 4, а затем каждые 2 цикла (например, цикл 6, 8, 10 и т.д.).
	Коэффициент конверсии MRD	Частота субъектов, достигших негативности MRD ( $10^{-3}$ ) в любой момент терапии	Оценки MRD будут проводиться при скрининге, в день 1 циклов 2, 3, 4, а затем каждые 2 цикла (например, цикл 6, 8, 10 и т.д.).
Поисковая	Продолжительность ответа MRD	Оценка стойкости ответа MRD путем серийной оценки аспирата костного мозга для MRD	Время от достижения первого ответа MRD до получения положительного результата на MRD или увеличения бремени заболевания по меньшей мере на один логарифм. Смерть будет подвергнута цензурированию.
	РК	Характеристика РК СС-90011	Все запланированные моменты времени в цикле 1 – цикле 3
Поисковая (продолженная)	РК/PD	Оценка взаимосвязи между биомаркерами РК/PD и клиническими исходами СС-90011 в комбинации с венетоклаксом и 5-азациитидином.	Цикл 1 и последующие циклы в указанные моменты времени
	Фармакодинамика	Экспрессия генов MMD и MYL9 в периферической крови	Выбор временных точек одновременно с РК (дни 1-22)

<b>Таблица 3: Конечные точки исследования</b>			
<b>Конечная точка</b>	<b>Название</b>	<b>Описание</b>	<b>Период времени</b>
	Фармакодинамика	CC-90011: Анализ маркеров миелоидного происхождения (например, CD86 и CD11b), субпопуляций иммунных клеток, а также популяций LSC и клеток-предшественников с использованием экспрессии генов и/или проточной цитометрии аспирации костного мозга в популяции MRD. AZA: изменения метилирования ДНК в крови; VEN: регуляторы апоптоза (BCL-2, MCL-1) с использованием экспрессии генов; профилирование ВНЗ	От зачисления до прекращения исследования
	Прогностические биомаркеры	Анализ генных мутаций из аспириатов костного мозга с использованием NGS Single cell RNAseq на отсортированных клетках MRD	От зачисления до прекращения исследования
	Уровень независимости от переливания крови после исходного уровня	Доля субъектов, которые были зависимы от переливания на исходном уровне и перешли на независимость от переливания после исходного уровня	От C1D1 до 28 дней после последней дозы.

Сокращения: AE = нежелательное явление; AZA = 5-азациитидин; BCL-2 = В-клеточная лимфома 2; ВНЗ = домен 3 гомологии BCL-2; C1D1 = цикл 1 день 1; CD = кластер дифференцировки; CD11b = CD11-антиген-подобный представитель В семейства; CR = полная ремиссия; CRh = CR с частичным гематологическим восстановлением; CRi = CR с неполным гематологическим восстановлением; CR<sub>MRD</sub> = CR без минимальной остаточной болезни; DLT = ограничивающая дозу токсичность; ДНК = дезоксирибонуклеиновая кислота; DOR = продолжительность ответа; ЭКГ = электрокардиограмма; ECOG = Восточная кооперативная онкологическая группа; EFS = бессобытийная выживаемость; ICF = форма информированного согласия; LVEF = фракция выброса левого желудочка; MLFS = морфологическое отсутствие лейкоза; LSC = лейкемическая стволовая клетка; MCL-1 = миелоидно-клеточный лейкоз 1; MLFS = морфологическое отсутствие лейкоза; MMD = моноциты, ассоциированные с дифференцировкой макрофагов; MRD = минимальная остаточная болезнь; MYL9 = легкая цепь 9 миозина; NCI = Национальный институт рака; NGS = секвенирование следующего поколения; ORR = общая частота ответов; OS = общая выживаемость; PD = фармакодинамика; PK = фармакокинетика; PR = частичная ремиссия; RNAseq = секвенирование рибонуклеиновой кислоты; RP2D = рекомендуемая доза фазы 2; VEN = венетоклак.

**[00233]** Субъекты, подходящие для включения, должны иметь недавно диагностированный АМЛ и должны быть неподходящими для интенсивной индукционной химиотерапии из-за возраста  $\geq 75$  лет или от  $\geq 60$  до 74 лет с сопутствующими заболеваниями, препятствующими использованию интенсивной индукционной химиотерапии.

**[00234]** Исследование будет состоять из 2 частей: части повышения дозы и части с применением максимально переносимой дозы, в которых будет участвовать приблизительно до 18 субъектов и 40 субъектов, соответственно.

**[00235]** На фиг. 21 показан общий дизайн исследования.

**[00236]** Все субъекты будут находиться в стационаре в течение цикла 1 для постепенного повышения дозы венетоклакса (дни 1-3) и по меньшей мере как минимум в течение дня 8 цикла 1. Субъекты могут продолжать исследуемое лечение до демонстрации документально подтвержденного рецидива от полной или частичной ремиссии (PR), прогрессирования заболевания, неприемлемого нежелательного явления, интеркуррентного заболевания, препятствующего дальнейшему назначению лечения, решения исследователя об исключении субъекта, отзыве своего согласия субъектом, несоблюдения требований к испытательному лечению или процедуре, смерти или административных причин.

**[00237]** **Повышение дозы.** Часть повышения дозы будет определять МТД (если она будет достигнута) и комбинированную рекомендуемую дозу фазы 2 (RP2D) СС-90011 с венетоклаксом и 5-азациитидином в 28-дневных циклах. Повышение дозы будет оценивать 3 уровня дозы СС-90011, 20 мг PO QW, 40 мг PO QW и 60 мг PO QW в комбинации со стандартной дозировкой венетоклакса и 5-азациитидина, и может включать в себя от 3 до 6 субъектов в каждой когорте доз. Часть повышения дозы будет охватывать приблизительно от 9 до 18 субъектов.

**[00238]** Повышение дозы будет определяться дизайном mTPI-2 (Guo, W. *et al.*, Contemp Clin Trials. 2017 Jul; 58:23-33), и альтернативные дозы и/или схемы могут быть изучены на основе обзора клинической безопасности и лабораторных данных SRC.

**[00239]** **Применение максимально переносимой дозы.** После определения МТД и/или RP2D тройной комбинированной терапии приблизительно 40 субъектов будут включены в часть применения максимально переносимой дозы, для дальнейшей оценки безопасности и предварительной эффективности вводимой комбинации RP2D СС-90011 с венетоклаксом и 5-азациитидином. Снижение дозы может происходить на основании наблюдаемой безопасности в соответствии с рекомендациями по изменению дозы.

**[00240]** **Фаза скрининга.** Процедуры скрининга субъектов будут проводиться в течение периода скрининга в течение 28 дней до начала исследуемого лечения. Форма информированного согласия (ICF) должна быть подписана и датирована субъектом и административным персоналом до начала любых других процедур исследования. Все скрининговые тесты и процедуры должны быть завершены в течение 28 дней до начала исследуемого лечения.

**[00241]** **Период лечения.** После подтверждения приемлемости субъекты будут включены в исследование и начнут лечение посредством перорального приема СС-90011 один раз в неделю непрерывными 4-недельными (28-дневными) циклами. Исследуемое лечение следует начинать в день 1 каждого цикла лечения с допустимым окном  $\pm 3$  дня. Предусмотренные исследованием визиты будут происходить ежедневно, начиная с дня 1 цикла 1 и до дня 8 цикла 1, затем по меньшей мере еженедельно в течение первых 3 циклов, затем каждые две недели (день 1 и день 15) в каждом последующем цикле, начиная с цикла 4.

**[00242]** Все субъекты будут госпитализированы в течение цикла 1 для увеличения дозы венетоклакса (дни 1-3) и по меньшей мере в течение дня 8 цикла 1, и будут получать профилактику и мониторинг синдрома лизиса опухоли (TLS). Эта госпитализация требуется в соответствии с протоколом и не является серьезным нежелательным явлением. При отсутствии остаточного морфологического лейкоза и при наличии продолжающейся цитопении по завершении цикла 1 введение СС-90011, венетоклакса и/или 5-азациитидина можно прервать на срок до 14 дней для обеспечения гематологического восстановления. Для лечения нейтропении, если пациент должен был достичь CRi или иметь состояние без морфологического лейкоза (MLFS) после завершения цикла 1, последующий цикл можно отложить, чтобы обеспечить восстановление ANC с дня 29 до тех пор, пока ANC не достигнет  $\geq 500$ /мкл или до 14 дней. Рецидивирующие явления нейтропении можно купировать снижением интенсивности лечения (т.е. венетоклаксом до 21 дня для последующих циклов и/или снижением дозы 5-азациитидина в соответствии с инструкцией по применению).

**[00243]** Интрасубъектное повышение дозы СС-90011 не разрешено во время цикла 1, но повышение дозы до дозы, впоследствии считающейся переносимой в когорте с более высокой дозой, может быть разрешено в более поздних циклах, если это одобрено SRC.

**[00244]** Чтобы обеспечить наилучшую возможность получить пользу от лечения и учитывая механизм действия СС-90011 и среднее время до ответа для комбинации венетоклакса и 5-азациитидина, исследователи должны стремиться лечить пациентов в течение по меньшей мере 3 циклов, хотя субъекты могут прекращать лечение раньше, если

они демонстрируют документально подтвержденный рецидив от CR или PR, прогрессирование заболевания, неприемлемое(ые) нежелательное(ые) явление(я), интеркуррентное заболевание, препятствующее дальнейшему назначению лечения, вследствие решения исследователя об исключении субъекта, отзыва согласия субъекта, несоблюдения требований к испытательному лечению или процедуре, смерти или административных причин.

**[00245]** Субъекты, которые прекращают прием СС-90011 по причинам, отличным от рецидива или резистентного заболевания, могут продолжать прием комбинации венетоклакса и 5-азациитидина до тех пор, пока не появятся признаки рецидива или резистентного заболевания или пока они больше не смогут переносить лечение из-за нежелательного явления, если субъекты получают пользу по усмотрению исследователя. Субъекты, прекратившие комбинированное лечение венетоклаксом и 5-азациитидином, также прекратят лечение СС-90011.

**[00246]** **Окончание лечения (ЕОТ).** Лечение будет продолжаться до документально подтвержденного рецидива от CR или PR, прогрессирования заболевания, неприемлемых нежелательных явлений, интеркуррентного заболевания, препятствующего дальнейшему назначению лечения, решения исследователя об исключении субъекта, отзыва согласия субъекта, несоблюдения требований к испытательному лечению или процедуре, смерти или административных причин.

**[00247]** Визит завершения лечения (ЕОТ) должен происходить в самую раннюю дату после последней дозы СС-90011 и в течение 14 дней с даты последней дозы. Если ЕОТ проводится во время запланированного визита, все оценки ЕОТ также должны быть завершены.

**[00248]** **Период последующего наблюдения.** В период последующего наблюдения субъекты будут находиться под наблюдением в течение 28 дней ( $\pm 3$  дня) после введения последней дозы СС-90011 или последнего визита в рамках исследования, в зависимости от того, какой период наступит позже, в рамках визита последующего наблюдения для оценки безопасности. После визита последующего наблюдения для оценки безопасности все субъекты будут наблюдаться каждые последующие 4 недели ( $\pm 2$  недели) для наблюдения за выживаемостью до 1 года или до смерти, утраты возможности последующего наблюдения, отзыва согласия на дальнейший сбор данных или конца испытания, в зависимости от того, что произойдет раньше. Последующее наблюдение за выживаемостью может проводиться путем просмотра записей (включая в себя общедоступные записи) и/или телефонного контакта с субъектом, семьей или лечащим врачом субъекта.

**[00249] Продолжительность исследования для субъектов.** Ожидаемая продолжительность всего исследования будет составлять приблизительно 5 лет, включая в себя период включения в исследование приблизительно 25 месяцев, максимальный 28-дневный период скрининга, период лечения 15 месяцев и период последующего наблюдения для оценки выживаемости продолжительностью 1 год после последней дозы. Фактическая продолжительность исследования будет зависеть от средней продолжительности лечения и последующего наблюдения за субъектами.

**[00250]** Ожидаемая продолжительность исследования для каждого отдельного субъекта будет составлять приблизительно 2 года, включая в себя максимальный 28-дневный период скрининга, период лечения приблизительно 15 месяцев и период последующего наблюдения для оценки выживаемости продолжительностью 1 год после последней дозы.

**[00251] Окончание испытания.** Окончание испытания будет определяться либо как дата последнего визита последнего субъекта для завершения последующего наблюдения после лечения, либо как дата получения последней точки данных от последнего субъекта, который требуется для первичного, вторичного и/или поискового исследования, как указано в протоколе, в зависимости от того, что наступит позже.

**[00252] Исследуемая популяция/оценочное количество пациентов.** В этом исследовании будет задействовано до 58 субъектов с AML, которые ранее не получали лечения и не подходят для интенсивной индукционной химиотерапии, приблизительно от 9 до 18 субъектов при повышении дозы и приблизительно 40 субъектов при применении максимально переносимой дозы.

**[00253] Ключевые критерии включения.** Субъекты должны удовлетворять следующим критериям для включения в исследование: (1) Субъект должен понять и добровольно подписать форму информированного согласия (ICF) до проведения любых связанных с исследованием оценок/процедур. (2) Субъект желает и может соблюдать график визита и другие требования протокола. (3) Гистологически подтвержденный ранее нелеченный AML согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и возраст  $\geq 75$  лет на момент подписания формы информированного согласия или от  $\geq 60$  до 74 лет на момент подписания ICF с сопутствующими заболеваниями, препятствующими использованию интенсивной индукционной химиотерапии, определяемой следующим образом: (а) возраст от 60 до 74 лет, по меньшей мере с одним из следующих сопутствующих заболеваний: (i) Восточная кооперативная онкологическая группа (ECOG), статус 2; (ii) застойная сердечная недостаточность (CHF) в анамнезе, требующая лечения, или фракция выброса  $\leq 50\%$ , или хроническая стабильная стенокардия,

определяемая с помощью многоканального сбора данных (MUGA) или эхокардиограммы (ЕСНО); (iii) клиренс креатинина от  $\geq 30$  мл/мин до  $<45$  мл/мин; (iv) умеренная печеночная недостаточность с общим билирубином от  $> 1,5$  до  $\leq 3,0$ -кратной от верхней границы нормы (ULN); (v) любое другое сопутствующее заболевание, которое врач считает несовместимым с интенсивной химиотерапией, должно быть рассмотрено Спонсором во время скрининга и до включения в исследование. (4) Предполагаемая продолжительность жизни субъекта должна составлять не менее 12 недель. (5) Субъект ранее не получал терапии по поводу АМЛ, за исключением гидроксимочевины для лечения гиперлейкоцитоза. (6) Субъект имеет рабочий статус ECOG от 0 до 2. (7) Субъекты должны иметь следующие лабораторные показатели скрининга: (a) количество лейкоцитов (WBC)  $\leq 25 \times 10^9$ /л. Гидроксимочевина или лейкаферез разрешены для соответствия этому критерию. (b) Калий и магний в пределах нормы или корректируются добавками. (c) Мочевая кислота  $\leq 7,5$  мг/дл (446 мкмоль/л). Допускается предварительное и/или одновременное лечение гипоурикемическими средствами (например, аллопуринолом, расбуриказой). Расбуриказа противопоказана субъектам с исходным дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD). (d) Международное нормализованное отношение (INR)  $< 1,5 \times \text{ULN}$  и активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT)  $< 1,5 \times \text{ULN}$ . (8) Адекватная функция органов, определяемая по: (a) функции почек: клиренс креатинина  $\geq 30$  мл/мин, рассчитанный по формуле Кокрофта-Голта или измеренный по сбору мочи за 24 часа; (b) Функция печени: AST, ALT  $\leq 3 \times \text{ULN}$ , билирубин  $\leq 1,5 \times \text{ULN}$ , за исключением случаев синдрома Жильбера или поражения лейкемических органов. Субъекты моложе 75 лет могут иметь билирубин  $\leq 3,0 \times \text{ULN}$ ; (c) Фракция выброса левого желудочка (LVEF)  $> 50\%$  по данным MUGA или ЕСНО. (9) Субъект должен иметь возможность и желание подвергнуться госпитализации, гидратации и лечению средством, снижающим мочевую кислоту, до первой дозы венетоклакса и во время цикла 1. (10) Женщина детородного возраста (FCBP) — это женщина, которая: 1) достигла менархе в какой-то момент, 2) не подвергалась гистерэктомии или двусторонней овариэктомии или 3) не находилась в естественной постменопаузе (аменорея после лечения рака или другое медицинское состояние не исключает возможности деторождения) в течение как минимум 24 месяцев подряд (т.е. у нее были менструации в любое время в течение предшествующих 24 месяцев подряд). Женщины, способные к деторождению, должны: (a) либо полностью воздерживаться\* от гетеросексуальных контактов (что должно пересматриваться ежемесячно и подтверждаться документально), либо согласиться использовать и быть в состоянии соблюдать один высокоэффективный способ контрацепции плюс один барьерный способ в течение следующих периодов времени, связанных с данным

исследованием: 1) с момента подписания ICF; 2) во время прохождения исследуемого лечения; 3) при перерывах в дозировании; и 4) в течение по меньшей мере 45 дней после последней дозы субъекту CC-90011, 30 дней после последней дозы венетоклакса или 90 дней после последней дозы 5-азацитидина, в зависимости от того, что наступит позже. К высокоэффективным способам контрацепции относятся комбинированные (содержащие эстрогены и прогестагены) или только прогестагенные гормональные контрацептивы, связанные с торможением овуляции (пероральные, инъекционные, интравагинальные, пластыри или имплантируемые); двусторонняя перевязка маточных труб; внутриматочная спираль (ВМС); внутриматочная гормон-рилизинг-система или вазэктомия партнера (обратите внимание, что вазэктомия партнера является высокоэффективным способом контроля над рождаемостью при условии, что партнер является единственным сексуальным партнером участника исследования FCBP и что партнер, подвергшийся вазэктомии, получил медицинскую оценку успеха хирургического вмешательства). Барьерными способами являются мужской или женский латексный или нелатексный синтетический презерватив, диафрагма, цервикальный колпачок или губка со спермицидом. (b) наличие двух отрицательных тестов на беременность, подтвержденных исследователем до начала исследуемого лечения: (i) отрицательный сывороточный тест на беременность (чувствительность по меньшей мере 25 мМЕ/мл) при скрининге; (ii) отрицательный результат теста на беременность в сыворотке или моче в течение 72 часов до дня 1 цикла 1 исследуемого лечения. Тест мочи на беременность должен иметь чувствительность по меньшей мере 25 мМЕ/мл. (c) Согласие на постоянное тестирование на беременность в ходе исследования. Это применимо, даже если субъект практикует истинное воздержание\* от гетеросексуальных контактов. (d) Избегание зачатия или донорства яйцеклеток во время лечения и в течение 45 дней после последней дозы CC-90011, 30 дней после последней дозы венетоклакса или 90 дней после последней дозы 5-азацитидина, в зависимости от того, что наступит позже. (11) Субъекты мужского пола должны: (a) практиковать истинное воздержание\* от гетеросексуальных контактов (что должно пересматриваться ежемесячно) или дать согласие на использование презерватива (рекомендуется латексный или синтетический презерватив без латекса) во время полового контакта с беременной женщиной или FCBP во время участия в исследовании, во время перерывов в приеме и в течение по меньшей мере 105 дней после последней дозы субъекта CC-90011, 95 дней после последней дозы венетоклакса или 90 дней после последней дозы 5-азацитидина, в зависимости от того, что наступит позже, даже если он перенес успешную вазэктомию. Согласие не сдавать сперму или сперматозоиды во время лечения и в течение по меньшей мере 105 дней после последней дозы CC-90011, 95 дней после последней дозы венетоклакса

или 90 дней после последней дозы 5-азациитидина, в зависимости от того, что наступит позже. (\*Настоящее воздержание допустимо, если оно соответствует предпочтительному и обычному образу жизни [Периодическое воздержание (например, календарное, овуляционное, симптотермальное; использование температуры тела для определения времени овуляции) и абстиненция не являются приемлемыми способами контрацепции].)

**[00254] Исследовательские продукты (СС-90011).** СС-90011 будет поставляться в виде капсул для перорального введения. Капсулы будут поставляться во флаконах из полиэтилена высокой плотности с крышкой, недоступной для открывания детьми, с соответствующей маркировкой для использования в исследовательских целях в соответствии с правилами соответствующего органа здравоохранения страны. Капсулы с составом СС-90011 доступны в следующих дозировках: 20 мг, 40 мг и 60 мг.

**[00255]** СС-90011 будет храниться при комнатной температуре (ниже 25°C [77°F]) и должен быть использован в течение индивидуально назначенного срока годности, указанного на этикетке. Субъекты не должны активно обращаться с капсулами СС-90011 и должны хранить их в упаковке до приема внутрь.

**[00256] Исследовательские продукты (Венетоклакс).** Венетоклакс (VENCLEXTA®) доступен в виде таблеток по 10 мг, 50 мг и 100 мг для перорального введения. Субъекты смогут получить коммерчески доступный продукт в аптеке местной больницы или у лицензированного дистрибьютора.

**[00257] Исследовательские продукты (5-азациитидин).** 5-азациитидин для инъекций поставляется в виде лиофилизированного порошка во флаконах с однократной дозой по 100 мг для разведения и введения. Субъекты смогут получить коммерчески доступный продукт в аптеке местной больницы или у лицензированного дистрибьютора.

**[00258] Назначение и схема лечения.** Чтобы обеспечить наилучшую возможность получить пользу от лечения, и учитывая механизм действия СС-90011 и среднее время до ответа на комбинацию венетоклакса и 5-азациитидина, субъекты будут получать лечение в течение по меньшей мере 3 циклов, хотя субъекты могут прекратить лечение раньше, если они демонстрируют документально подтвержденный рецидив от CR или PR, прогрессирование заболевания, неприемлемое нежелательное явление(я), интеркуррентное заболевание, препятствующее дальнейшему назначению лечения, вследствие решения исследователя об исключении субъекта, отзыва согласия субъекта, несоблюдения требований к испытательному лечению или процедуре, смерти или административных причин. При отсутствии этих причин субъекты могут продолжать исследуемое лечение.

**[00259]** Субъекты, которые прекращают прием СС-90011 по причинам, отличным от рецидива или резистентного заболевания, могут продолжать прием комбинированных

лекарственных средств до тех пор, пока не появятся признаки рецидива или резистентного заболевания, или пока они больше не смогут переносить лечение из-за нежелательного явления, если субъекты получают выгоду по усмотрению исследователя. Субъекты, прекратившие комбинированное лечение венетоклаксом и 5-азациитидином, также прекратят лечение СС-90011.

**[00260]** СС-90011 будет вводиться перорально один раз в неделю в виде непрерывных 4-недельных (28-дневных) циклов (в дни 1, 8, 15 и 22). СС-90011 будет вводиться по меньшей мере с 240 мл (8 унций) воды. Субъекты должны голодать в течение как минимум 4 часов до введения СС-90011 и воздерживаться от приема пищи в течение 1 часа после введения дозы. Субъекты должны воздерживаться от приема пищи или других лекарственных средств в течение по меньшей мере 1 часа после каждой дозы.

**[00261]** Часть повышения дозы начнется с дозы СС-90011, составляющей 20 мг PO QW в 28-дневных циклах. При переносимости может быть открыта когорта второго уровня дозы 40 мг PO QW, за которой следует запланированная когорта третьего уровня дозы 60 мг PO QW. Если дополнительная информация о безопасности и переносимости СС-90011 будет доступна в любое время в ходе проведения исследования, можно изучить альтернативные дозы и/или схемы в соответствии с рекомендацией SRC.

**[00262]** Когда СС-90011, венетоклакс и 5-азациитидин должны быть введены в один и тот же день, сначала вводят СС-90011, затем 5-азациитидин и затем венетоклакс, по меньшей мере через 6 часов после дозы СС-90011.

**[00263]** Венетоклакс будут вводить в соответствии с утвержденной инструкцией (Venclexta®, 2019) перорально QD в дни с 1 по 28 каждого 28-дневного цикла. Кратковременное увеличение дозы происходит для цикла 1: 100 мг в день 1, 200 мг в день 2 и 400 мг в день 3. Венетоклакс вводят по 400 мг в последующие дни. Субъекты будут госпитализированы во время увеличения дозы венетоклакса в цикле 1 и, как минимум, в день 8 цикла 1. Эта госпитализация требуется в соответствии с протоколом и не представляет собой серьезного нежелательного явления. Субъекты должны быть проинструктированы принимать суточную дозу приблизительно в одно и то же время каждый день  $\pm$  6 часов. Каждую дозу следует принимать с едой и водой и потреблять в течение как можно более короткого времени. Субъекты должны быть проинструктированы глотать таблетки целиком и не жевать таблетки. Употребление грейпфрута, продуктов из грейпфрута, апельсинов Севильи (включая мармелад, содержащий апельсины Севильи) или старфрута в течение 3 дней до первой дозы венетоклакса и до последней дозы венетоклакса запрещено.

**[00264]** 5-Азациитидин будут вводить в соответствии с утвержденной инструкцией (VIDAZA®, 2018) в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> с 1 по 7 день каждого 28-дневного цикла в виде внутривенной инфузии или подкожной инъекции.

**[00265]** Если 5-азациитидин будут вводить внутривенно, его следует вводить контралатерально руке, используемой для сбора РК СС-90011. Это относится только к дню 1 цикла 1, когда выполняется интенсивный сбор образцов РК для СС-90011.

**[00266]** В случае пропуска 2 или менее доз в течение 7-дневного периода дозированного введения следует продолжать дозированное введение, чтобы субъект получил полные 7 дней терапии. Если пропущены 3 или более дней в течение 7-дневного периода дозированного введения, исследователь должен связаться со спонсором, и решение о дозированном введении будет приниматься в каждом конкретном случае.

**[00267]** **Определение субъекта, подлежащего оценке на предмет DLT.** Все субъекты, получившие по меньшей мере одну дозу СС-90011 и/или комбинированного(ых) лекарственного(ых) средства(-), подлежат оценке на предмет безопасности.

**[00268]** После введения первой дозы в любой группе субъектов во время повышения дозы субъекты в каждой группе будут наблюдаться в течение по меньшей мере 28 дней (цикл 1, окно DLT), прежде чем может начаться следующая когорта с более высокой дозой, указанной в протоколе.

**[00269]** Для того чтобы субъект считался подходящим для оценки DLT, субъект должен либо иметь DLT цикла 1 после получения по меньшей мере одной дозы СС-90011, либо завершить цикл 1 без DLT. Если субъект исключен из исследования по причине, отличной от токсичности (например, по личным причинам или прогрессированию заболевания) до завершения 75% запланированных доз СС-90011 (т.е. 3 из 4 доз СС-90011 за 28 дней) и 80% от общего количества запланированных доз венетоклакса и 5-азациитидина (т.е. > 22 доз венетоклакса; ≥ 6 доз 5-азациитидина) первого цикла терапии, этот субъект не будет считаться завершившим цикл лечения и будет заменен.

**[00270]** **Критерии повышения дозы в следующей когорте субъектов.** SRC будет принимать решения о повышении дозы. Для уровня дозы, который должен быть выбран SRC для применения максимально переносимой дозы, по меньшей мере 6 субъектов должны быть оценены на DLT в части повышения дозы, чтобы объявить переносимый уровень дозы.

**[00271]** Количество уровней дозы зависит от частоты DLT. Субъект может испытать более одного DLT. Решения о повышении дозы основаны на количестве субъектов, испытывающих события DLT.

**[00272]** **Оценка эффективности.** Серийные образцы крови и костного мозга будут использоваться для определения ответа на исследуемую лекарственную терапию, начиная с цикла 2, день 1.

**[00273]** На исходном уровне требуется образец аспирата костного мозга (ВМА). Биопсия должна быть собрана, если аспират недоступен, и может быть собрана в дополнение к аспирации в соответствии с практикой учреждения. Цитогенетическое и молекулярное профилирование из ВМА также требуется при скрининге (если они не доступны для ввода из медицинских карт субъекта за последние 90 дней). Полный анализ крови, мазки периферической крови (PBS) и ВМА будут использоваться для определения ответа на терапию в определенные моменты времени. Образцы можно получить за 4 дня до окончания цикла, например, с 25 по 28 день.

**[00274]** Ответ на лечение будет оцениваться исследователем на основании сообщаемых гематологических лабораторных параметров, мазка периферической крови, аспиратов костного мозга и/или биопсий.

**[00275]** Гематологический ответ будут оценивать по мере того, как субъекты с предшествующими гематологическими нарушениями могут быть включены в исследование. Трансфузионная зависимость определяется как получение  $\geq 2$  единиц эритроцитов и/или тромбоцитов в течение 8 недель до исследуемого лечения. Независимость от переливания определяется как период в 8 недель без переливаний.

**[00276]** Субъекты должны пройти оценку в конце лечения, когда исследуемое лечение прекращается. Причина прекращения лечения будет записана на страницах eCRF и в исходном документе.

**[00277]** Статус MRD также будут оценивать с помощью MFC и/или NGS централизованно при каждой заборе костного мозга.

**[00278]** Минимальное остаточное заболевание будут оценивать одновременно с оценкой эффективности и будут оценивать централизованно. Центр обеспечит сбор и хранение образцов периферической крови и аспирата костного мозга (ВМА)/биопсии костного мозга (ВМВ) для исследовательского тестирования во время каждого забора костного мозга.

**[00279]** Прогрессирующее заболевание будут определять как: (1) увеличение  $> 50\%$  процентного содержания бластов в костном мозге по сравнению с исходным (скрининговым) количеством бластов в костном мозге (минимальное увеличение балла на 15% требуется в случаях с  $< 30\%$  бластов на исходном уровне; или постоянное количество бластов в костном мозге  $> 70\%$  в течение по меньшей мере 3 месяцев; без улучшения по меньшей мере на 100% абсолютного числа нейтрофилов (ANC) до абсолютного уровня ( $>$

0,5 × 10<sup>9</sup>/л) и/или числа тромбоцитов > 50 × 10<sup>9</sup>/л без переливания), или А > 50% увеличение периферических бластов (лейкоциты × % бластов) до > 25 × 10<sup>9</sup>/л (> 25000/мкл) (при отсутствии синдрома дифференцировки), или новое экстрамедуллярное заболевание.

**[00280]** Дату прогрессирования заболевания определяют как первую дату, когда наблюдалось либо > 50% увеличение количества бластов в костном мозге по сравнению с исходным уровнем, либо сохранение количества бластов в костном мозге > 70% у субъекта с исходным количеством бластов в костном мозге > 70%, удвоение числа бластов в периферической крови или новое экстрамедуллярное заболевание.

**[00281]** Неудача лечения будет определяться как прогрессирующее заболевание или отсутствие достижения по меньшей мере PR. При отсутствии прогрессирующего заболевания (как определено выше) или неприемлемой токсичности субъекты могут продолжать лечение, если они получают пользу, по мнению исследователя.

**[00282]** Аспирацию костного мозга и биопсию следует проводить в соответствии со стандартом медицинской помощи и анализировать в местной лаборатории в соответствии с рекомендациями Международного совета по стандартизации в гематологии (ICSH).

**[00283]** Критерии ответа при остром миелоидном лейкозе будут суммированы по категориям наилучшего общего ответа: частота CR/CRh и частота общего ответа (ORR). ORR включает в себя все ответы полной ремиссии (т.е. CR, CR<sub>MRD</sub>-, CRi), морфологическое состояние без лейкоза (MLFS) и частичную ремиссию (PR). Частота ответа минимальной остаточной болезни (MRD) и коэффициент конверсии MRD также будут оценивать как переменные эффективности.

**[00284]** Другие показатели клинической активности, включая в себя общую выживаемость (OS), бессобытийную выживаемость (EFS) и продолжительность ответов (CR/CRh и ORR), будут суммированы.

**[00285]** После прекращения лечения сбор данных о выживаемости планируется каждые 4 недели в течение 1 года после последней дозы или до смерти, невозможности последующего наблюдения или отзыва согласия на дальнейший сбор данных.

**[00286]** Для оценки РК СС-90011 в плазме образцы крови будут собирать у всех субъектов в определенные моменты времени. Совпадающие по времени тройные ЭКГ также будут собирать в день 1 цикла 1 и день 2 цикла 1 в определенные моменты времени.

\* \* \* \* \*

**[00287]** Настоящее раскрытие было описано в связи с некоторыми вариантами осуществления и примерами; однако, если не указано иное, заявленное изобретение не

должно быть чрезмерно ограничено такими конкретными вариантами осуществления и примерами.

**[00288]** Хотя некоторые варианты осуществления были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что в них могут быть внесены изменения и модификации в соответствии с обычными навыками в настоящей области техники без отклонения от технологии в ее более широких аспектах, как определено в следующей формуле изобретения.

**[00289]** Варианты осуществления, иллюстративно описанные в настоящем документе, могут надлежащим образом применяться на практике при отсутствии какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в настоящем документе. Так, например, термины «содержащий», «включающий в себя», «состоящий» и т.д. следует понимать расширительно и без ограничений. Кроме того, используемые в настоящем документе термины и выражения использовались в качестве терминов описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений нет намерения исключить любые эквиваленты показанных и описанных функций или их частей, но признано, что в рамках заявляемой технологии возможны различные модификации. Кроме того, фраза «состоящий в основном из» будет пониматься как включающая в себя те элементы, которые конкретно указаны, и те дополнительные элементы, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленной технологии. Фраза «состоит из» исключает любой элемент, который не указан.

**[00290]** Кроме того, если признаки или аспекты раскрытия описаны в терминах групп Маркуша, специалистам в данной области техники будет понятно, что раскрытие тем самым также описано в терминах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

**[00291]** Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, для любых и всех целей, в частности, с точки зрения предоставления письменного описания, все диапазоны, раскрытые в настоящем документе, также охватывают любые и все возможные поддиапазоны и комбинации их поддиапазонов, включая в себя конечные точки. Любой из перечисленных диапазонов может быть легко распознан как достаточно описывающий и позволяющий разбить один и тот же диапазон по меньшей мере, на равные половины, трети, четверти, пятые, десятые доли и т.д. В качестве неограничивающего примера каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем документе, может быть легко разбит на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, все формулировки, такие как «до», «по меньшей мере», «больше чем», «меньше чем» и тому подобное включают в себя указанное число и относятся к диапазонам,

которые впоследствии могут быть разбиты на поддиапазоны, как обсуждалось выше. Наконец, как будет понятно специалисту в настоящей области техники, диапазон включает в себя каждого отдельного представителя.

**[00292]** Все публикации, патентные заявки, выданные патенты и другие документы, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка, выданный патент или другой документ были конкретно и отдельно указаны для полного включения посредством ссылки. Определения, содержащиеся в тексте, включенном посредством ссылки, исключаются в той мере, в какой они противоречат определениям в настоящем раскрытии.

**[00293]** Другие варианты осуществления изложены в следующей формуле изобретения.

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения субъекта-человека, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), причем указанный способ предусматривает введение субъекту комбинации (i) фармацевтической композиции, содержащей 5-азациитидин, (ii) по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства и (iii) ингибитора лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1) или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п. 1, при котором субъект не подходит для интенсивной индукционной химиотерапии.

3. Способ по п. 1, при котором:

(a) одновременно вводят 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство или

(b) 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят последовательно, причем 5-азациитидин вводят первым.

4. Способ по п. 1, при котором:

(a) 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство составляют совместно в виде единичной лекарственной формы или

(b) 5-азациитидин и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство составляют в виде отдельных лекарственных форм.

5. Способ по п. 1, при котором:

(a) 5-азациитидин и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно или

(b) 5-азациитидин и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно.

6. Способ по п. 1, при котором:

(a) 5-азациитидин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно или

(b) 5-азациитидин, по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство и ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят последовательно.

7. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят:

(a) подкожно или внутривенно и/или

(b) в дозе от около 75 мг/м<sup>2</sup> до около 100 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно; и/или

(c) в дозе около 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно или внутривенно; и/или

(d) подкожно или внутривенно ежедневно в течение первых семи дней 28-дневного цикла.

8. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят:

(a) в дозе около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 550 мг или 600 мг перорально и/или

(b) в дозе около 200 мг; и/или

(c) в дозе около 300 мг; и/или

(d) в течение первых семи, четырнадцати или двадцати одного дня 28-дневного цикла; и/или

(e) субъекту-человеку один или два раза в день; и/или

(f) в форме капсулы или таблетки.

9. Способ по п. 8, при котором 5-азациитидин вводят в форме таблетки без энтеросолюбильного покрытия.

10. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят перорально:

(a) в дозе около 200 мг в сутки в течение 14 дней в 28-дневном цикле;

(b) в дозе около 300 мг в сутки в течение 14 дней в 28-дневном цикле;

(c) в дозе около 200 мг в сутки в течение 21 дня в 28-дневном цикле или

(d) в дозе около 300 мг в сутки в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

11. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят перорально:

(a) ежедневно в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 дней;

(b) ежедневно в течение 14 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней;

(c) в течение 21 или более дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней;

(d) в течение 14 дней, необязательно с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней;

(e) в течение 21 или более дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 или более дней или

(f) в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней.

12. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят перорально:

(a) в дозе около 300 мг в день в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней;

(b) в дозе около 200 мг в день в течение 14 дней с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 14 дней;

(c) в дозе около 300 мг ежедневно в течение 21 дня с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней или

(d) в дозе около 200 мг в день с последующим перерывом в приеме лекарственного средства на 7 дней;

13. Способ по п. 1, при котором 5-азациитидин вводят перорально:

(a) с использованием цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 7 дней в 28-дневном цикле;

(b) с использованием цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 14 дней в 28-дневном цикле или

(c) с использованием цикла лечения, предусматривающего введение 5-азациитидина в день в течение 21 дня в 28-дневном цикле.

14. Способ по п. 1, при котором по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство включает в себя гилтеритиниб, мидостаурин, квизартиниб, энаседениб, ивосидениб и/или венетоклакс.

15. Способ по п. 14, при котором по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой венетоклакс.

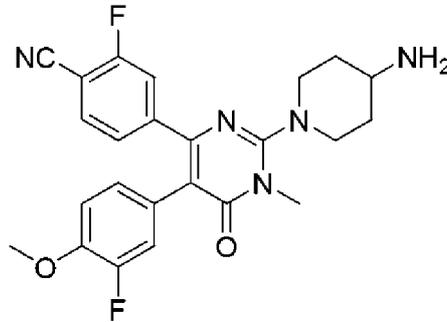
16. Способ по п. 15, при котором венетоклакс вводят:

(a) перорально и/или

(b) в форме таблетки; и/или

- (с) ежедневно; и/или
- (d) в дозе около 400 мг.

17. Способ по п. 1, при котором ингибитор LSD-1 представляет собой соединение, характеризующееся структурой:



или его фармацевтически приемлемую соль.

18. Способ по п. 17, при котором ингибитор LSD-1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят:

- (a) перорально и/или
- (b) в форме таблетки или капсулы; и/или
- (с) один раз в неделю; и/или
- (d) в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг.

19. Способ по п. 1, при котором:

- (a) AML устойчив к лечению только 5-азациитидином и/или
- (b) AML устойчив к лечению только одним дополнительным терапевтическим средством; и/или
- (с) AML устойчив к лечению только ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью; и/или
- (d) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином отдельно; и/или
- (e) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с одним 5-азациитидином около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%,

около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%; и/или

(f) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению по меньшей мере только с одним дополнительным терапевтическим средством; и/или

(g) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению по меньшей мере только с одним дополнительным терапевтическим средством около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%; и/или

(h) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью; и/или

(i) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с ингибитором LSD-1 или его фармацевтически приемлемой солью около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%; и/или

(j) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли; и/или

(k) комбинация 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией любых двух из 5-азациитидина, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%,

около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%; и/или

(l) 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством; и/или

(m) 5-азациитидин, вводимый перорально, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство увеличивают гибель клеток AML по сравнению с 5-азациитидином, вводимым внутривенно или подкожно, и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%; и/или

(n) комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли; и/или

(o) комбинация 5-азациитидина, вводимого перорально, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли увеличивает гибель клеток AML по сравнению с комбинацией 5-азациитидина, вводимого внутривенно или подкожно, по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, ингибитора LSD-1 и его фармацевтически приемлемой соли около на 10%, около на 15%, около на 20%, около на 25%, около на 30%, около на 35%, около на 40%, около на 45%, около на 50%, около на 55%, около на 60%, около на 65%, около на 70%, около на 75%, около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или около на 100%.

20. Способ по п. 1, при котором способ предусматривает:

(a) введение 5-азациитидина подкожно или внутривенно субъекту один раз в день в течение первых 7 дней 28-дневного цикла;

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и

(с) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

21. Способ по п. 1, при котором способ предусматривает:

(а) введение 5-азацитидина подкожно или внутривенно субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 28-дневного цикла;

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и

(с) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

22. Способ по п. 21, дополнительно предусматривающий:

(а) введение 5-азацитидина в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(с) введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

23. Способ по п. 22, предусматривающий одновременное введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла.

24. Способ по п. 1, предусматривающий:

(а) введение 5-азацитидина в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  подкожно или внутривенно каждый день в течение первых семи дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(с) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

25. Способ по п. 24, при котором введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

26. Способ по п. 1, при котором способ предусматривает следующие стадии:

(a) пероральное введение 5-азациитидина субъекту один раз в день в течение первых 14 дней 28-дневного цикла;

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту один раз в день в течение 28-дневного цикла и

(c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

27. Способ по п. 1, при котором способ предусматривает следующие стадии:

(a) пероральное введение 5-азациитидина субъекту в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 28-дневного цикла;

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дни 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 и 28 28-дневного цикла и

(c) введение ингибитора LSD-1 или его фармацевтически приемлемой соли субъекту в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла.

28. Способ по п. 27, дополнительно предусматривающий:

(a) введение 5-азациитидина в дозе около 300 мг каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(c) введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

29. Способ по п. 28, предусматривающий одновременное введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла.

30. Способ по п. 1, предусматривающий:

(a) введение 5-азацитидина в дозе около 300 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(c) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

31. Способ по п. 30, при котором введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

32. Способ по п. 27, дополнительно предусматривающий:

(a) введение 5-азацитидина в дозе около 200 мг каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе по меньшей мере около 100 мг каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(c) введение субъекту ингибитора LSD-1 в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

33. Способ по п. 32, предусматривающий одновременное введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства в дозе около 100 мг в день 1, в дозе около 200 мг в день 2, в дозе около 300 мг в день 3 и в дозе около 400 мг в дни 4-28 28-дневного цикла.

34. Способ по п. 1, предусматривающий:

(a) введение 5-азацитидина в дозе около 200 мг перорально каждый день в течение первых четырнадцати дней 28-дневного цикла и/или

(b) введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту в дозе около 400 мг перорально каждый день в течение 28-дневного цикла; и/или

(c) введение ингибитора LSD-1 субъекту в дозе около 20 мг, около 40 мг или около 60 мг перорально один раз в неделю в течение 28-дневного цикла.

35. Способ по п. 34, при котором введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства включает в себя введение венетоклакса.

36. Способ по п. 1, при котором острый миелоидный лейкоз включает в себя острый миелоидный лейкоз с рецидивирующими генетическими аномалиями, острый миелоидный лейкоз с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные новообразования, связанные с терапией, миелоидную саркому, миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна, бластное плазмацитоидное дендритное клеточное новообразование и/или острый промиелоцитарный лейкоз.

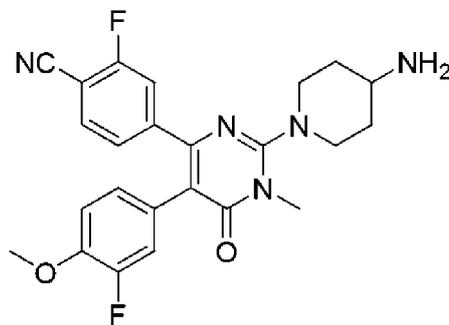
37. Способ лечения субъекта-человека, страдающего острым миелоидным лейкозом (AML), которому не подходит интенсивная индукционная химиотерапия, предусматривающий введение субъекту-человеку:

(i) в первом непрерывном 28-дневном цикле:

(a) 5-азацитидина подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7;

(b) венетоклакса перорально в дозе около 100 мг в день 1; около 200 мг в день 2 и около 400 мг в дни с 3 по 28; и

(c) фармацевтической композиции, содержащей безилатную соль следующего соединения:



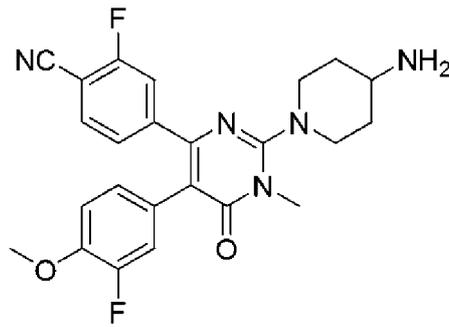
в дни 1, 8, 15 и 22; и

(ii) в последующие 28-дневные циклы:

(d) 5-азацитидин подкожно или внутривенно ежедневно в дозе около  $75 \text{ мг/м}^2$  в дни с 1 по 7 каждого последующего цикла;

(e) венетоклакс перорально в дозе около 400 мг в дни с 1 по 28 каждого последующего цикла и

(f) фармацевтическую композицию, содержащую безилатную соль следующего соединения



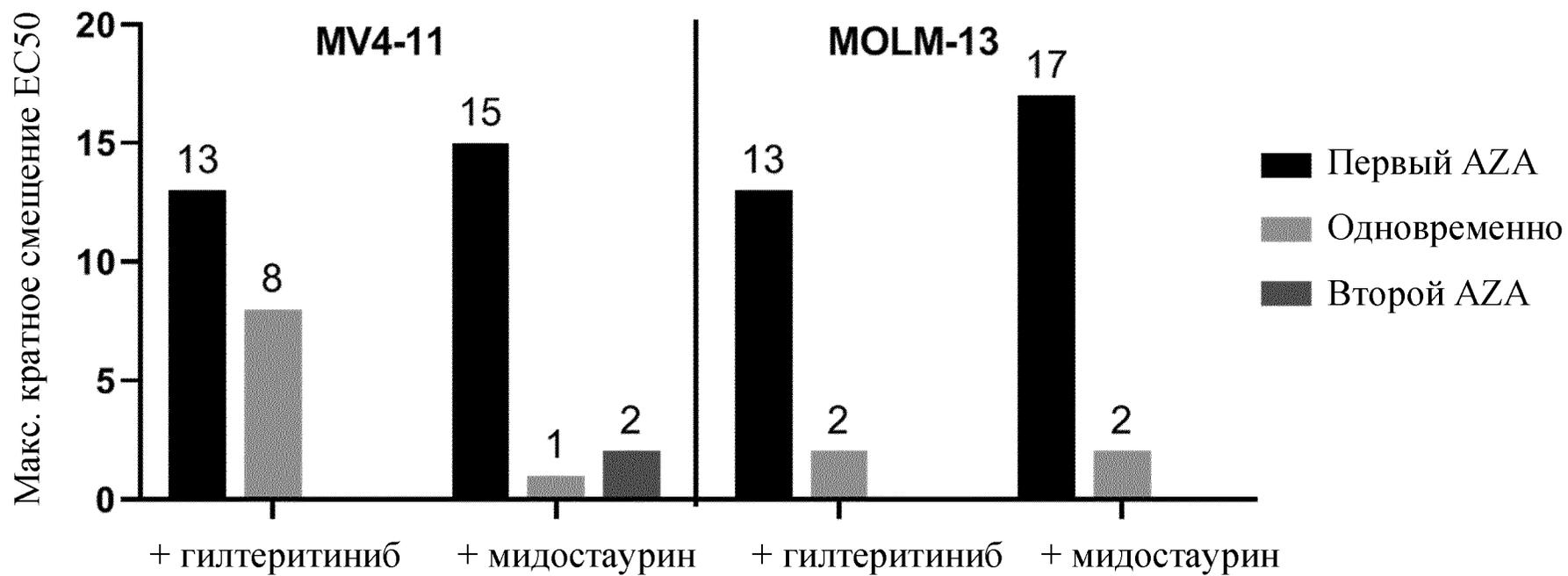
в дни 1, 8, 15 и 22 каждого последующего цикла.

38. Способ по п. 37, при котором фармацевтическую композицию вводят в:

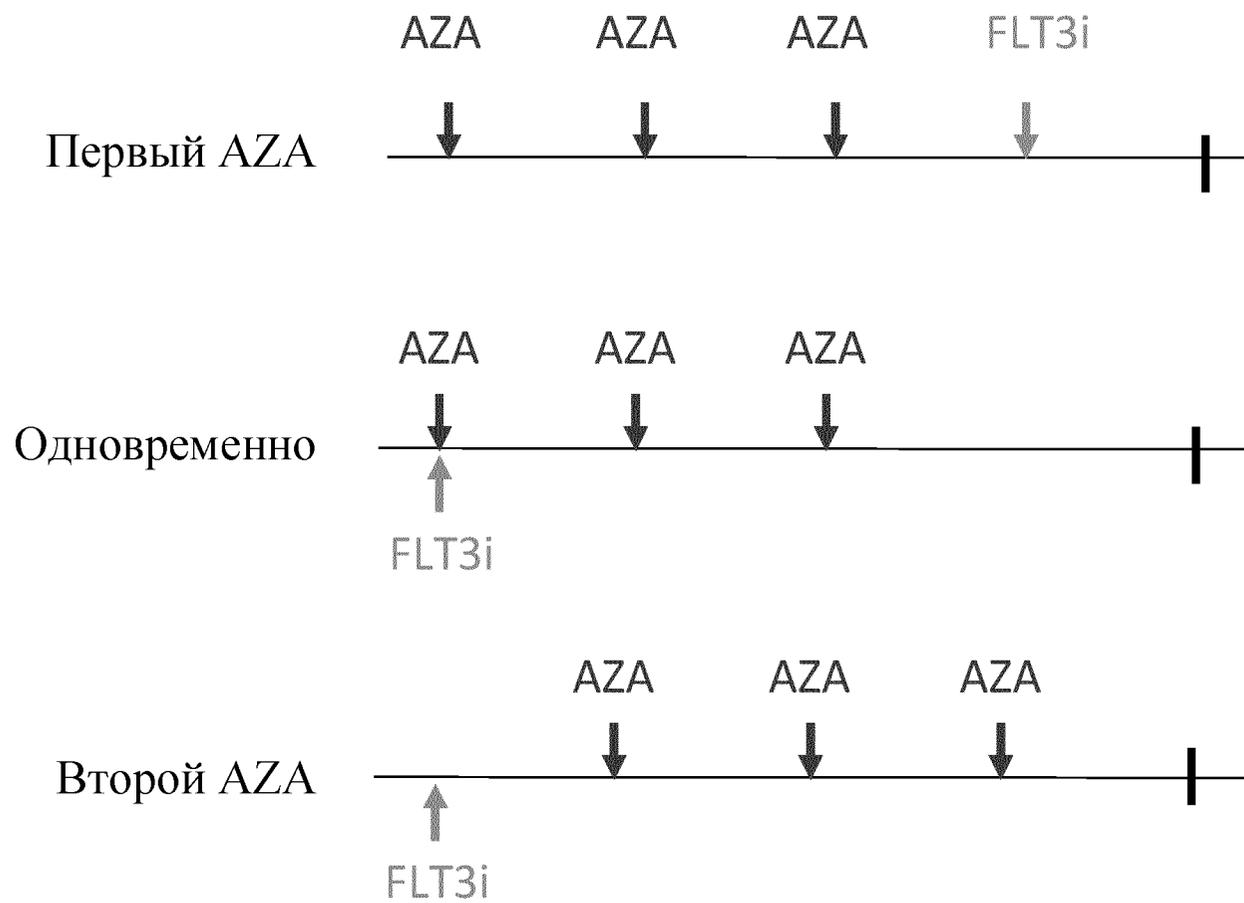
- (a) дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах;
- (b) дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах или
- (c) дозе около 60 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

39. Способ по п. 38, при котором фармацевтическую композицию вводят в дозе около 20 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах; и если доза 20 мг является переносимой, то открывается когорта второй дозы, в которой фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.

40. Способ по п. 39, при котором если доза 40 мг является переносимой, то открывается когорта третьей дозы, в которой фармацевтическую композицию вводят в дозе около 40 мг в первом непрерывном 28-дневном цикле и последующих 28-дневных циклах.



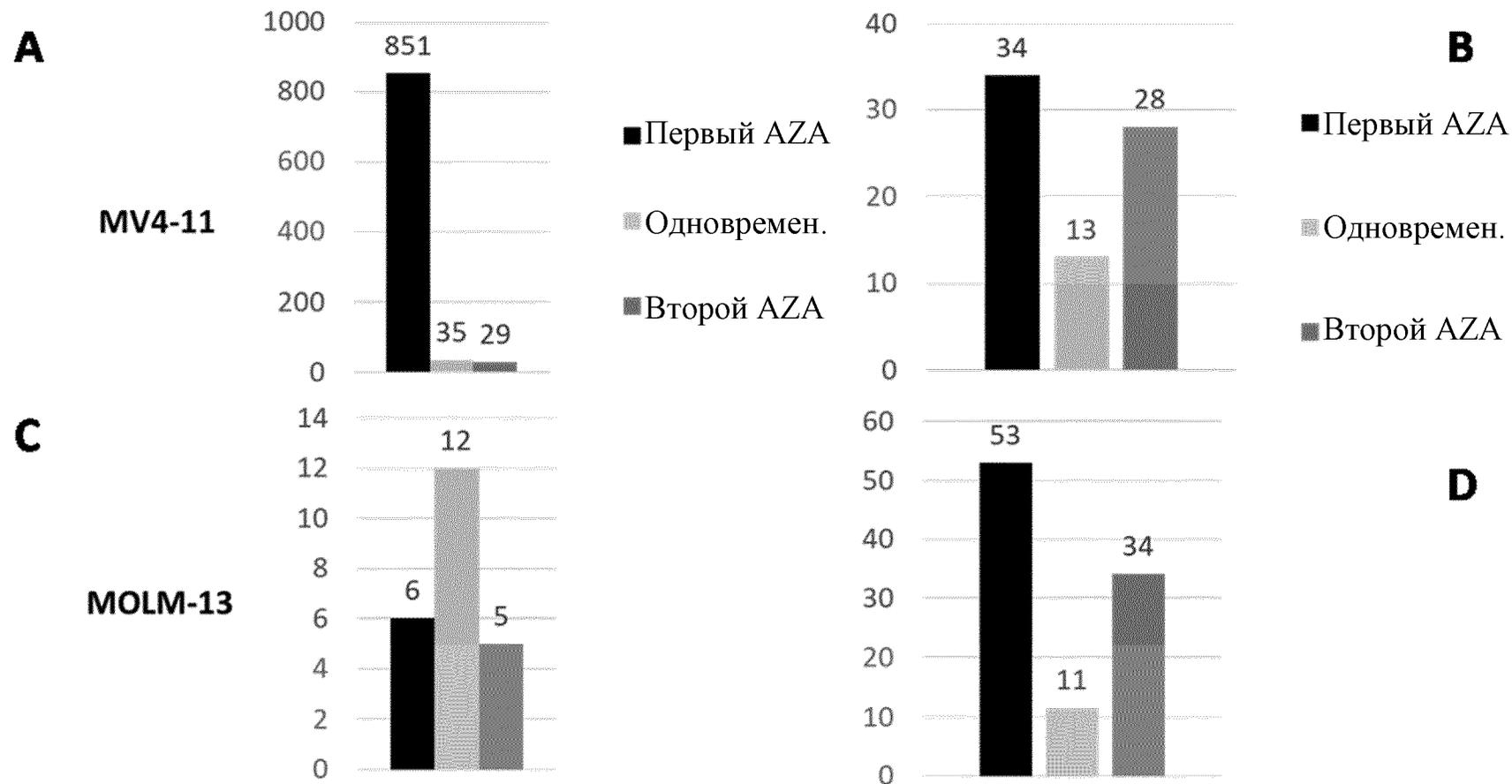
Фиг. 1



Фиг. 2

Макс. смещение EC50 относительно AZA (венетоклакс)

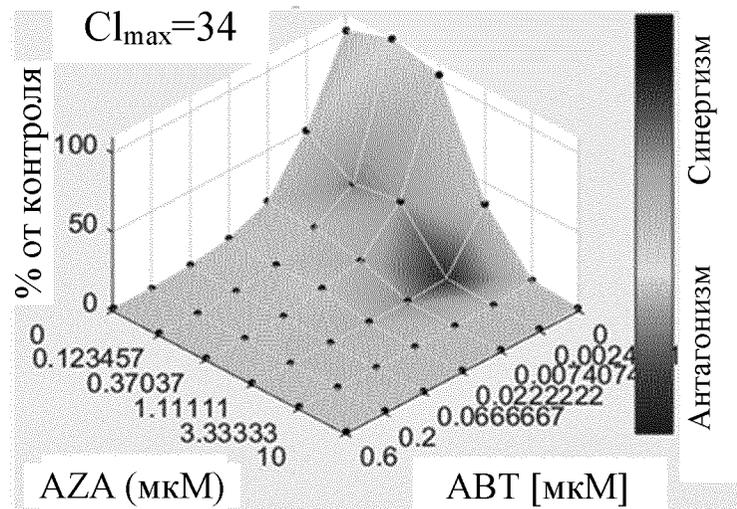
Индекс синергизма



Фиг. 3

**A**

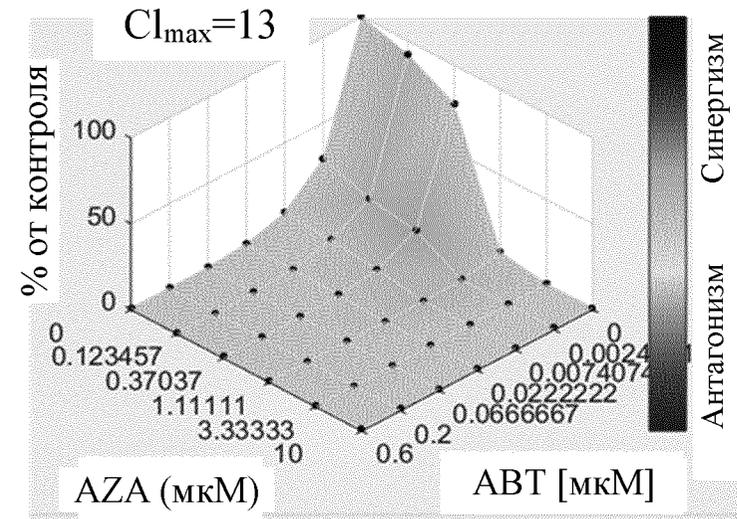
Первый AZA



AZA (мкМ)

Венетоклакс (мкМ)

Одновременно

**B**

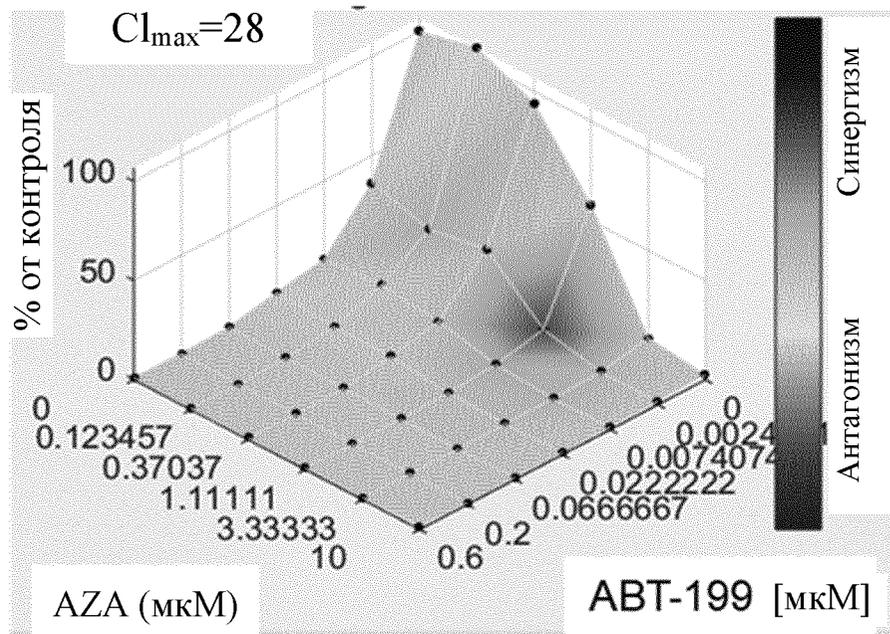
AZA (мкМ)

Венетоклакс (мкМ)

Фиг. 4

**С**

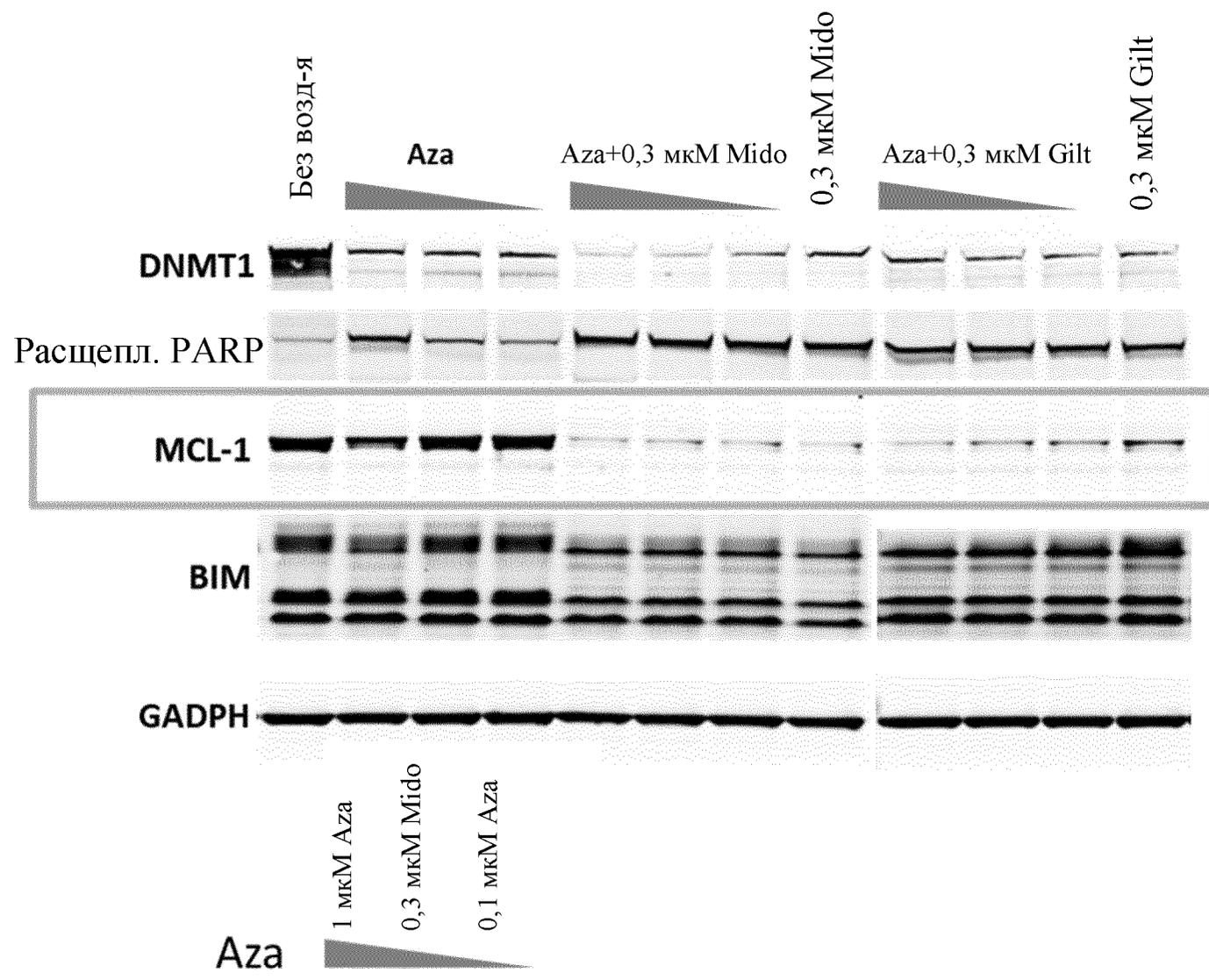
Первый венетоклак



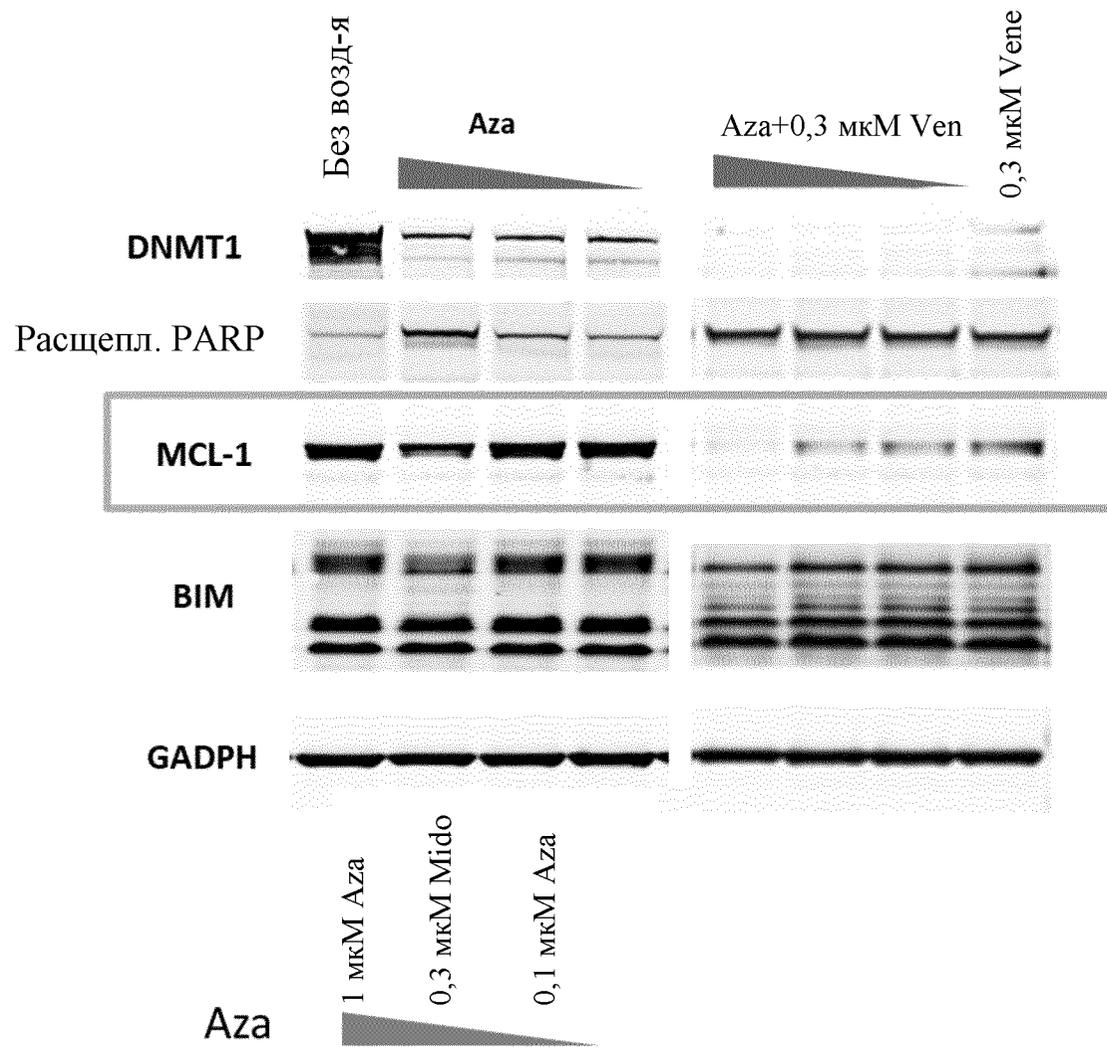
AZA (мкМ)

Венетоклак (мкМ)

**Фиг. 4 (продолжение)**

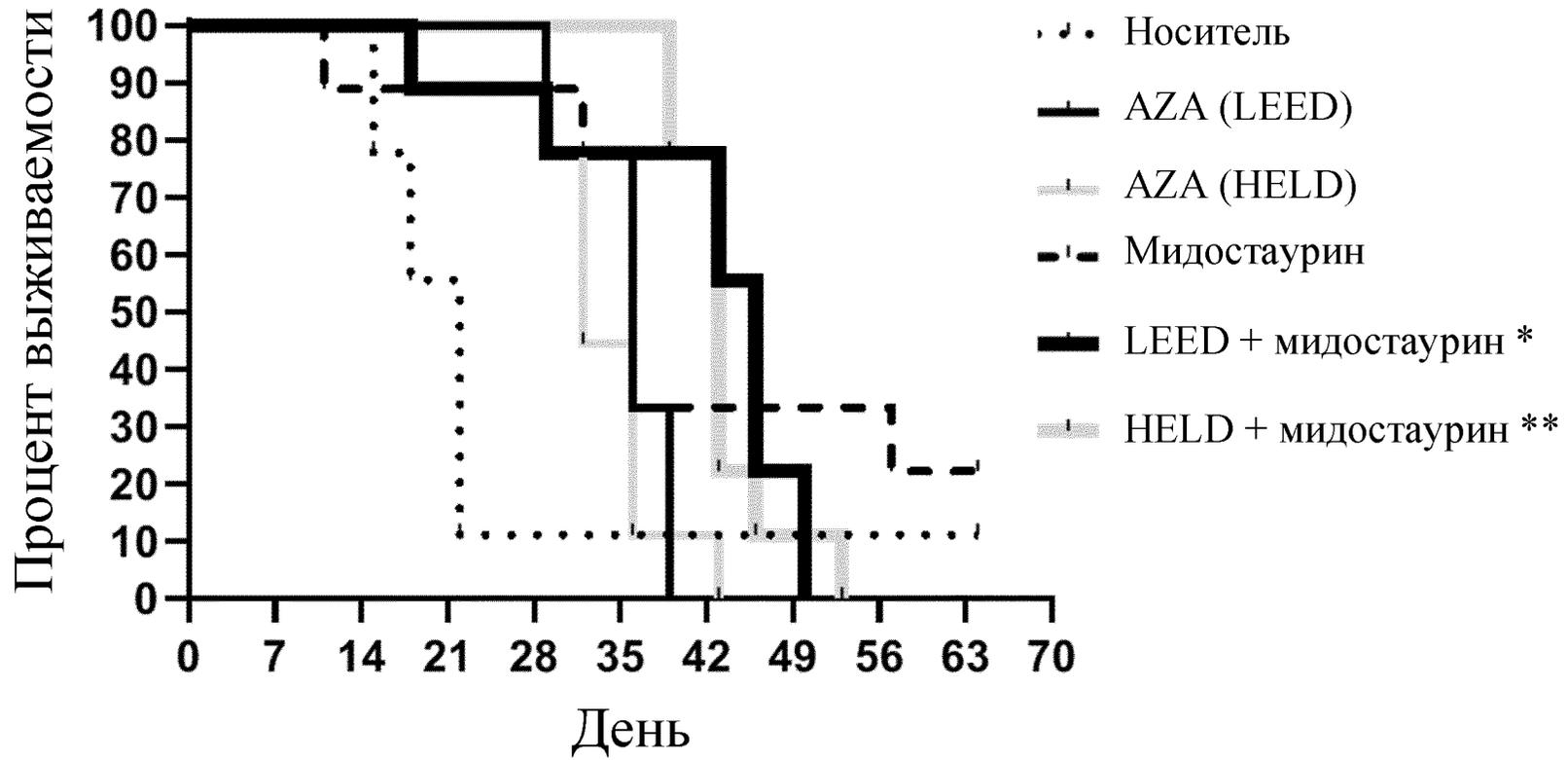


Фиг. 5



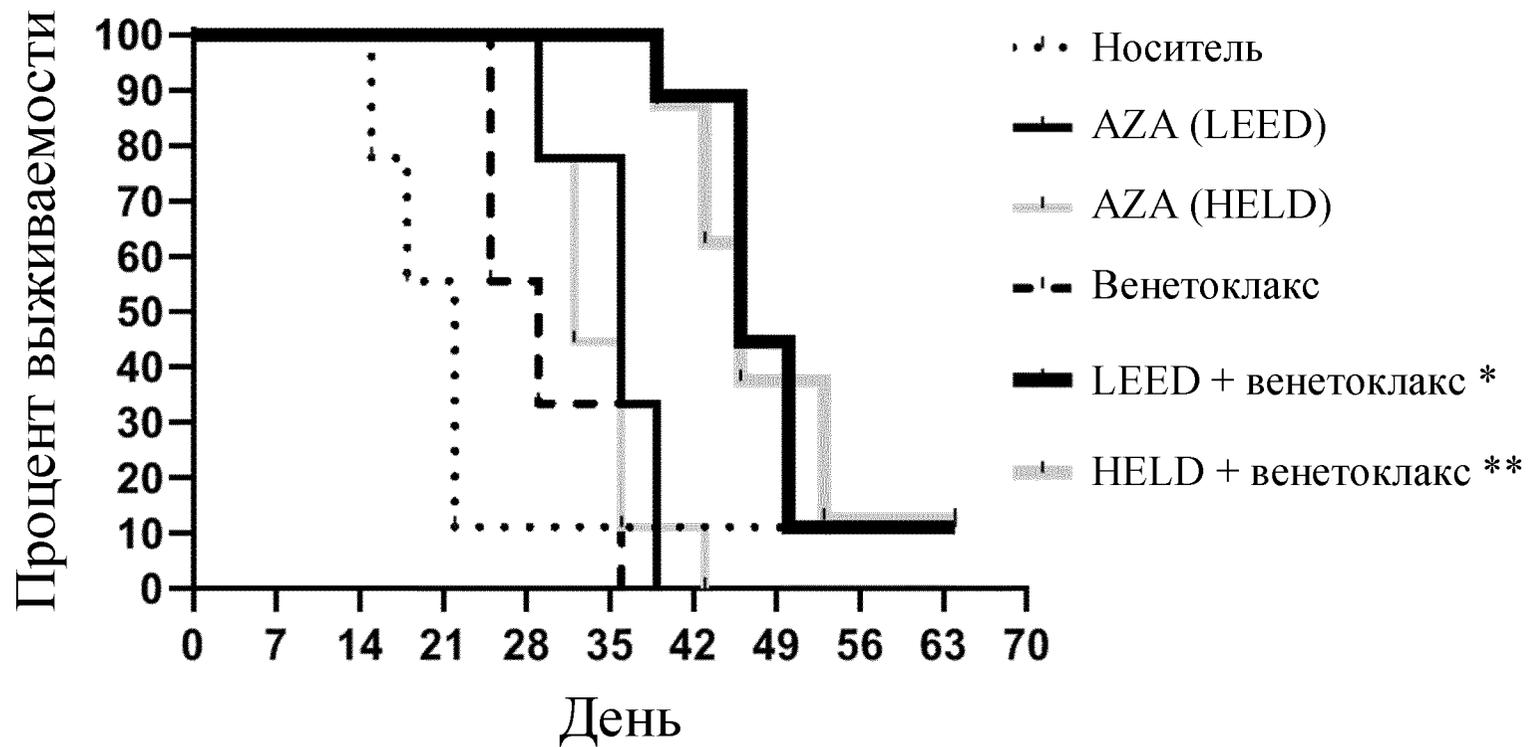
Фиг. 6

# 5-азацитидин/мидостаурин



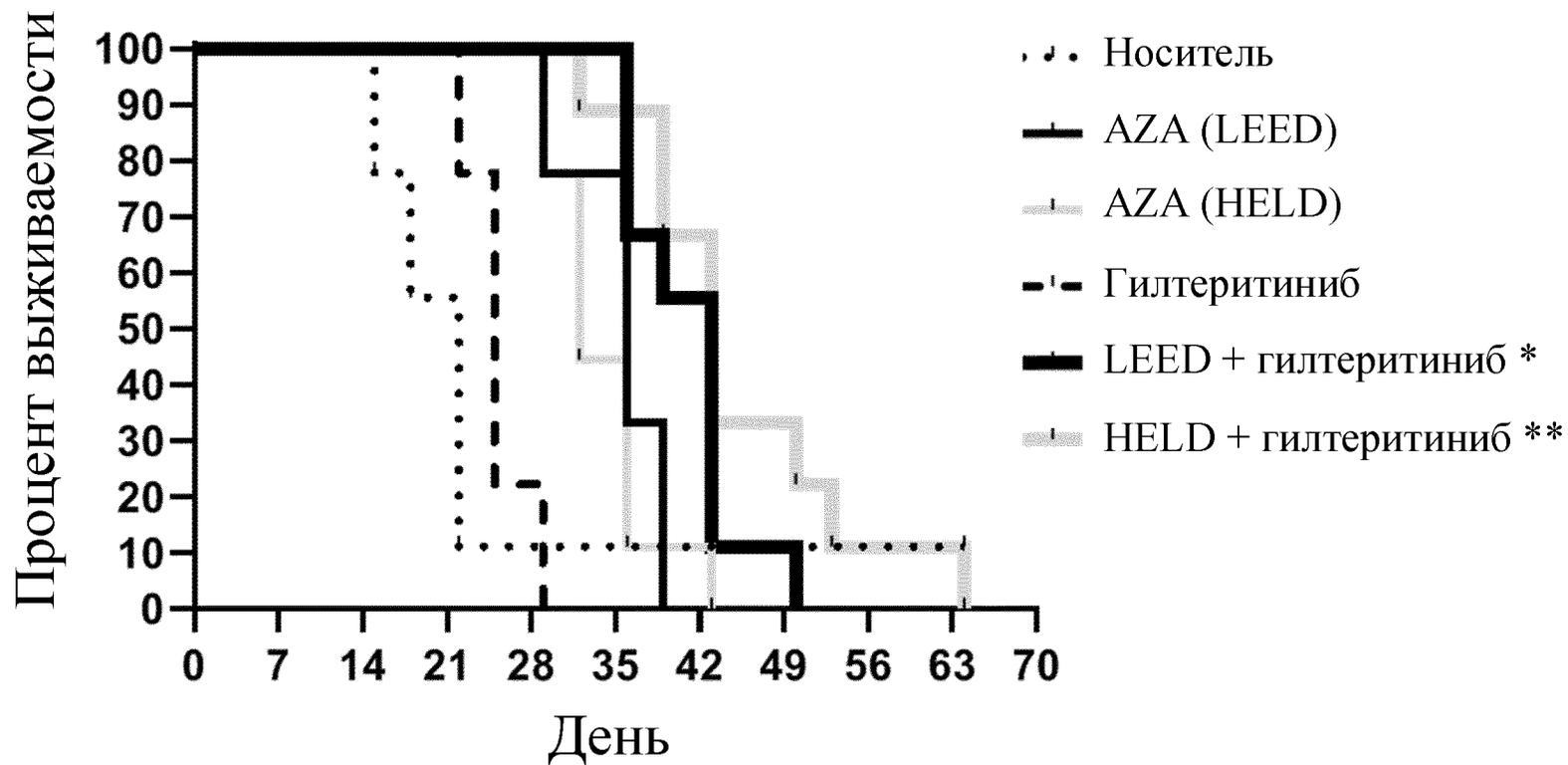
Фиг. 7А

# 5-азацитидин/венетоклак

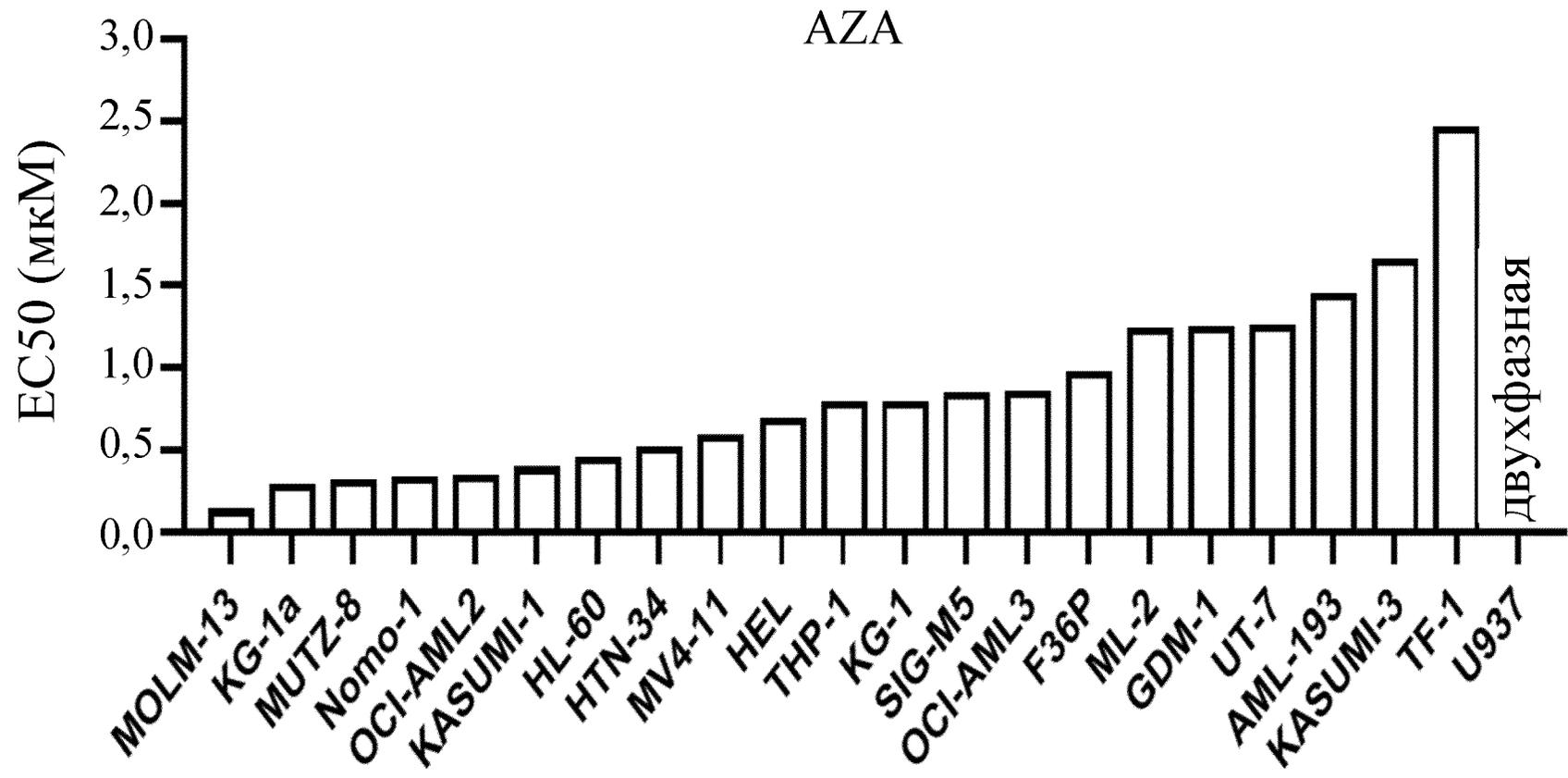


Фиг. 7В

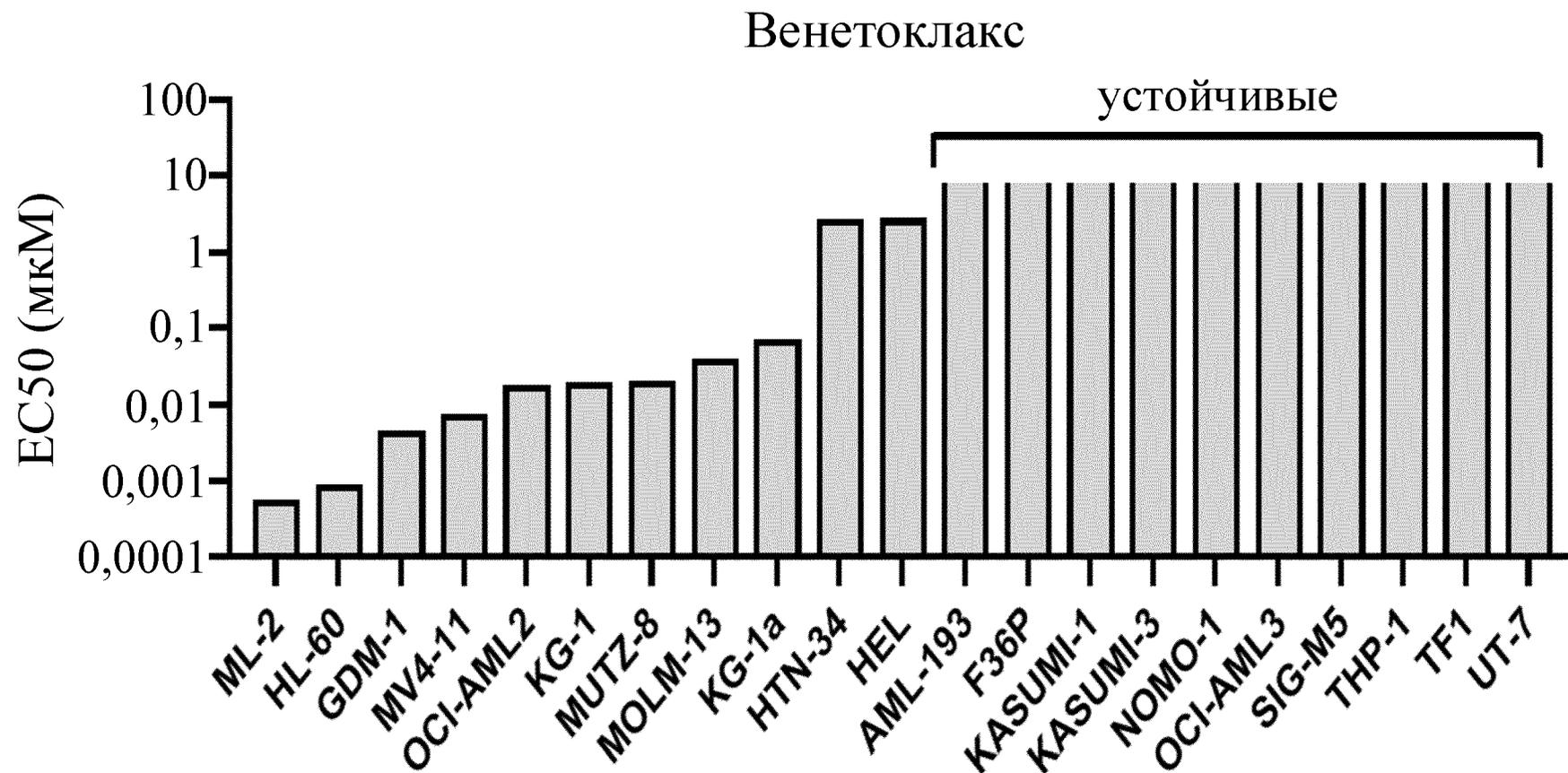
# 5-азацитидин/гилтеритиниб



Фиг. 7С



Фиг. 8А



Фиг. 8В

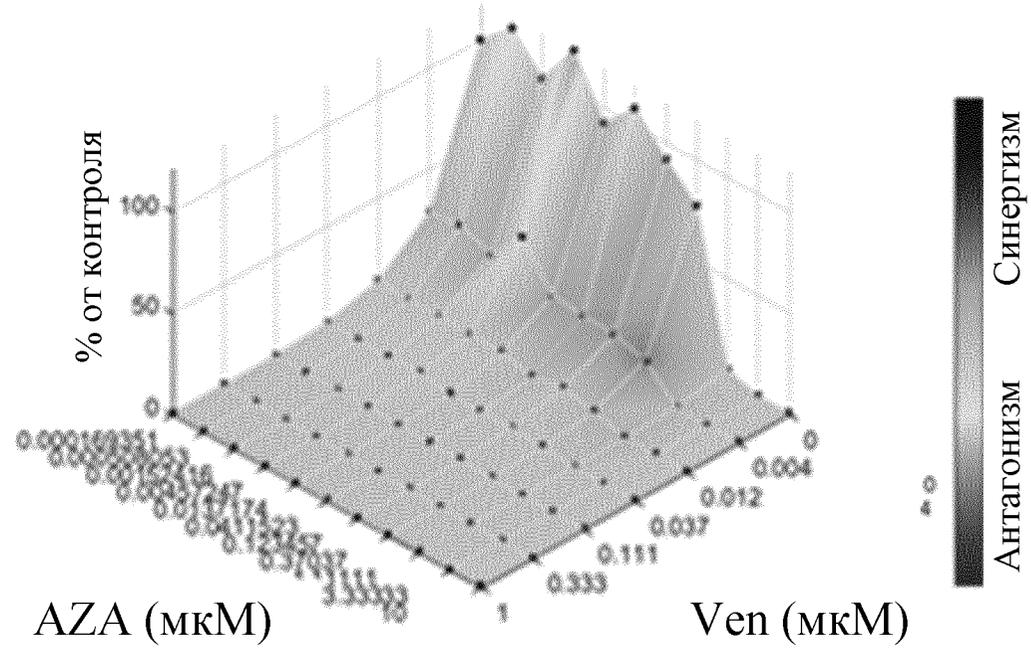


Фиг. 8С



# Одновременно

MV4-11



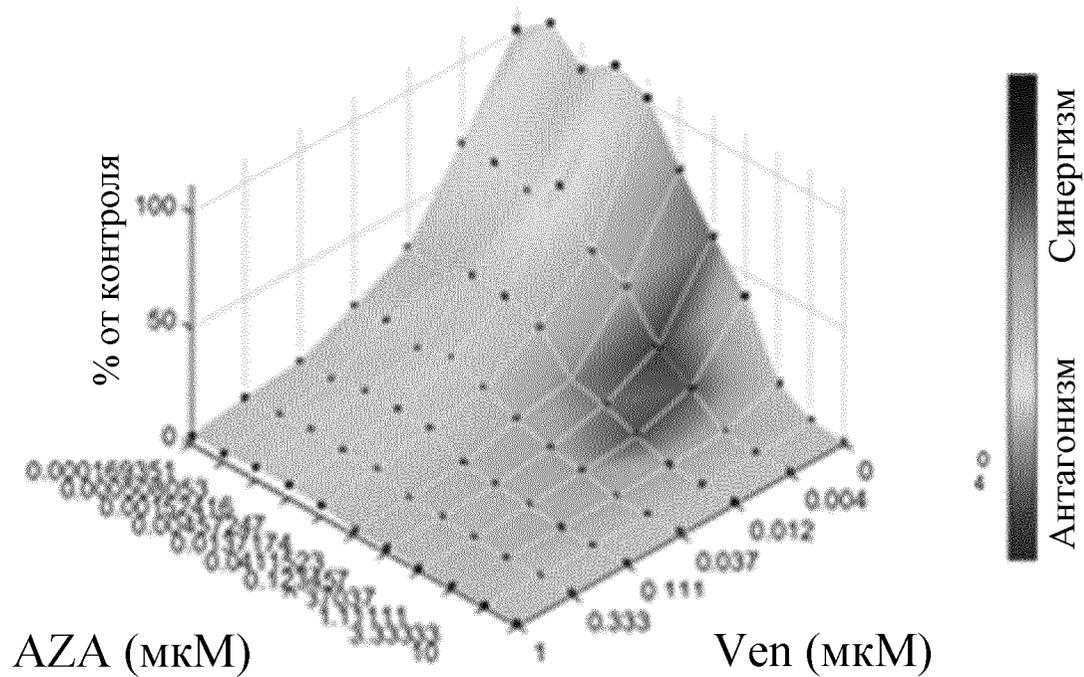
SI: 13

Фиг. 9В



# Первый AZA

MOLM-13

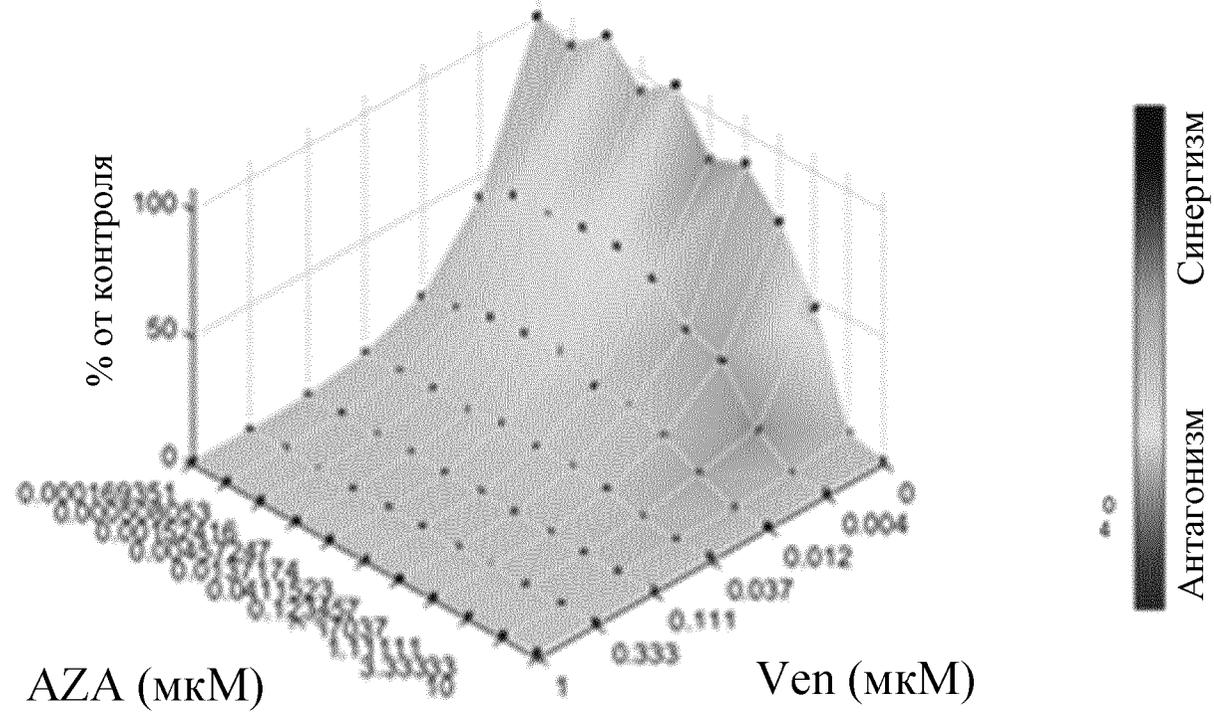


SI: 32

Фиг. 9D

# Одновременно

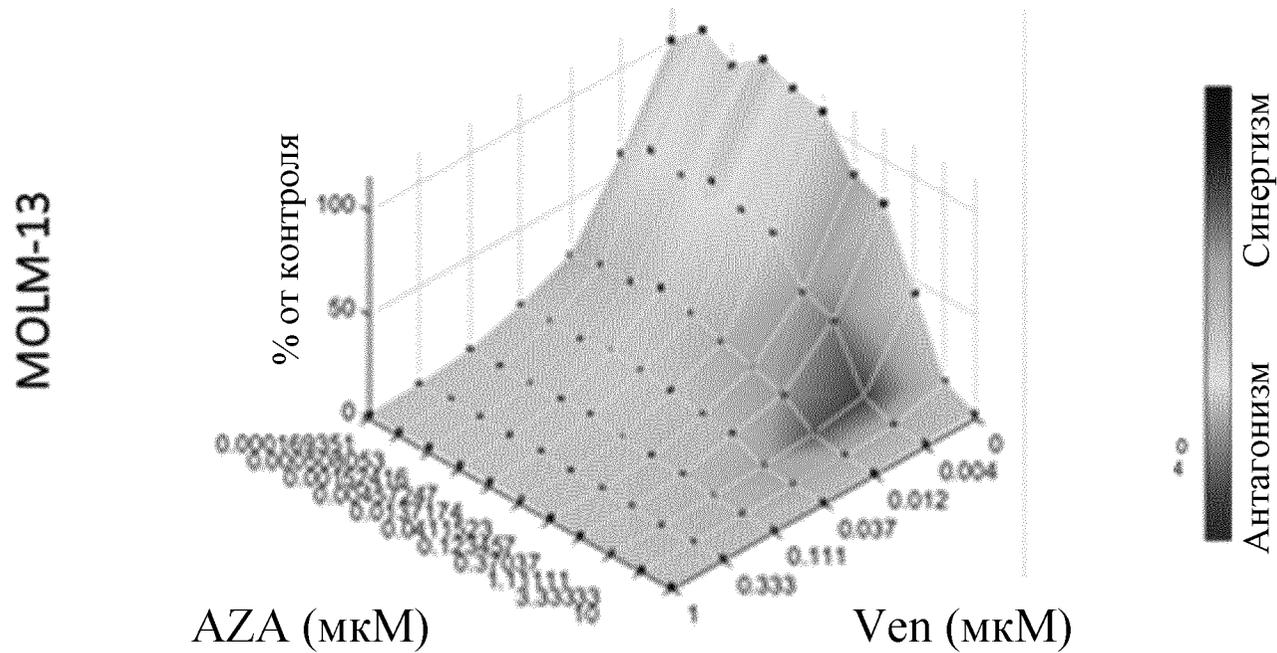
MOLM-13



SI: 10

Фиг. 9E

# Первый венетоклакс



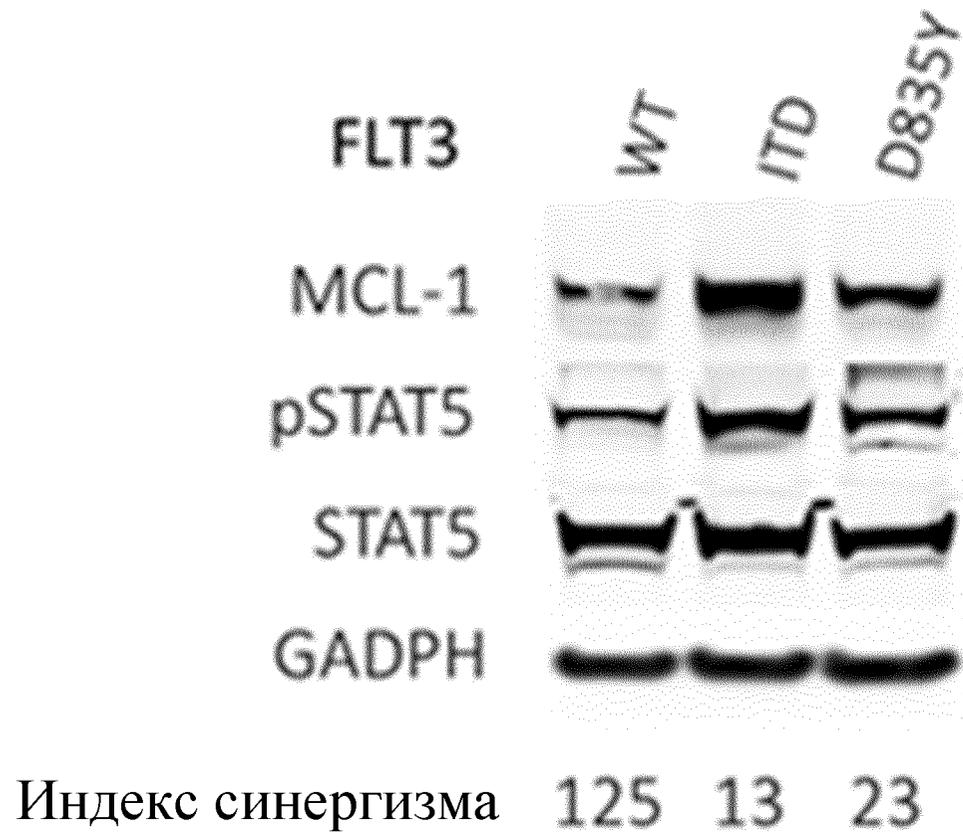
SI: 29

Фиг. 9F

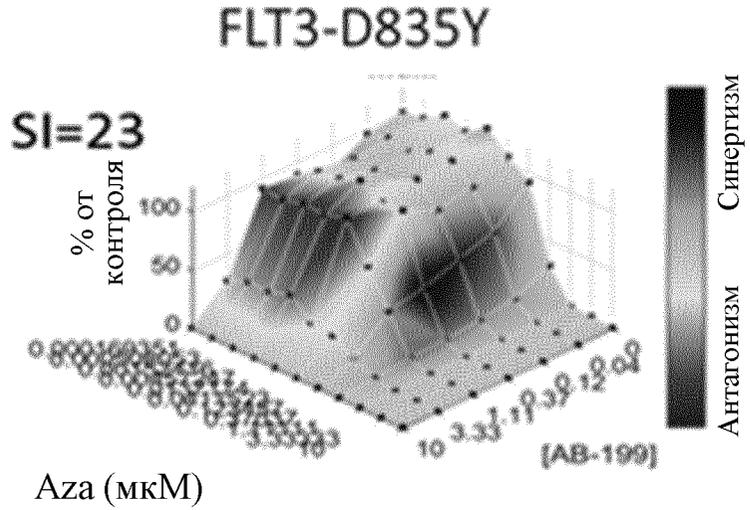
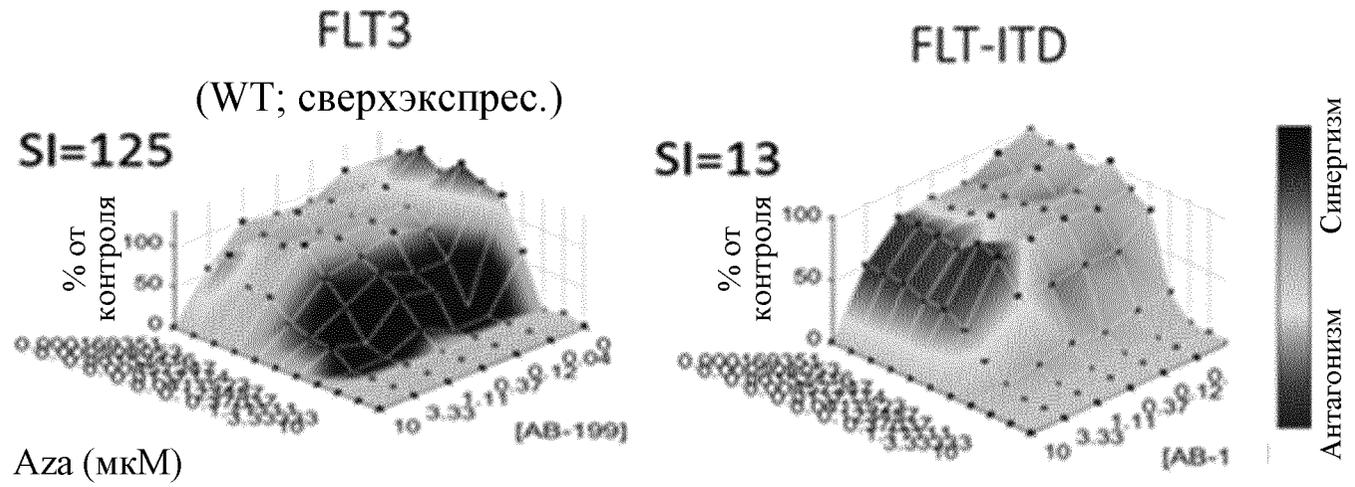
**Клетки BaF3, экспрессирующие различные FLT3 (EC50, нМ)**

	BaF-FLT3(WT)	BaF-FLT3-ITD	BaF-FLT3(D835Y)
AZA	189	598	456
Гилтеритиниб	4	1,8	1,8
Мидостаурин	23	5,5	5,4
Квизартиниб	3	0,008	9,5
Венетоклакс	>10000	>10000	4332

**Фиг. 10А**

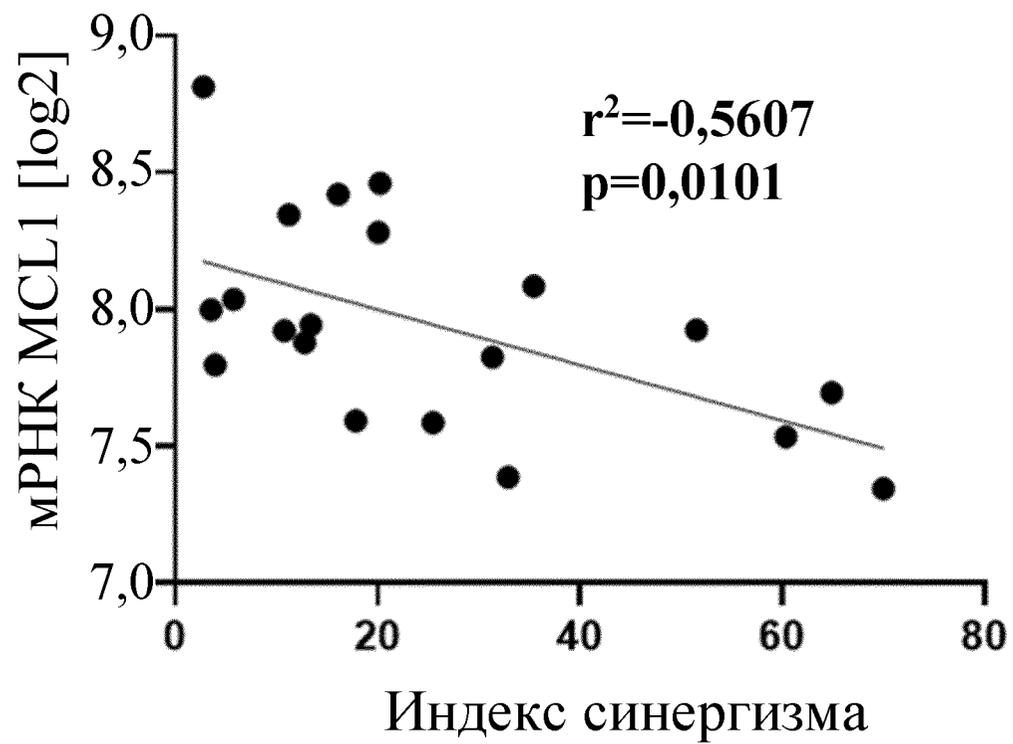


Фиг. 10В

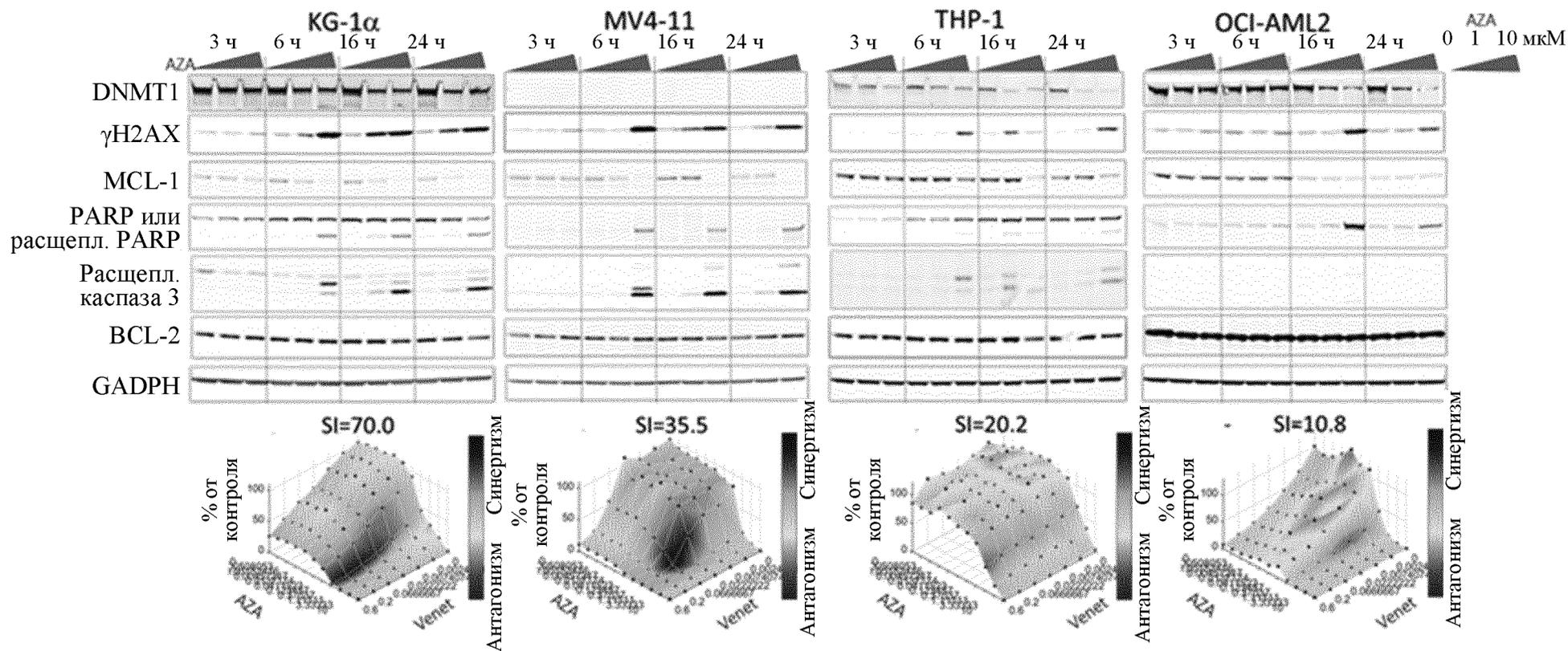


**Фиг. 10С**

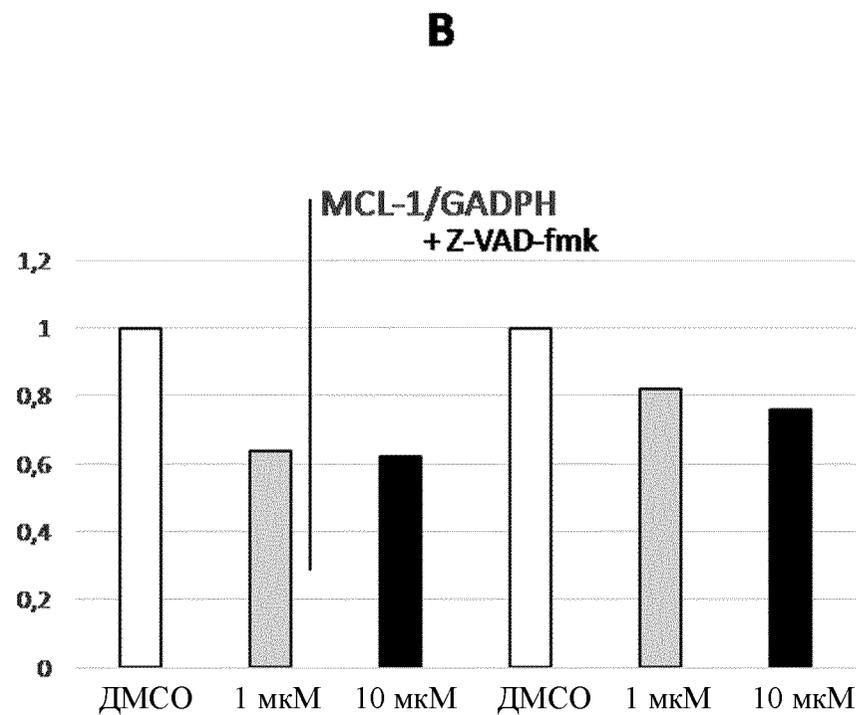
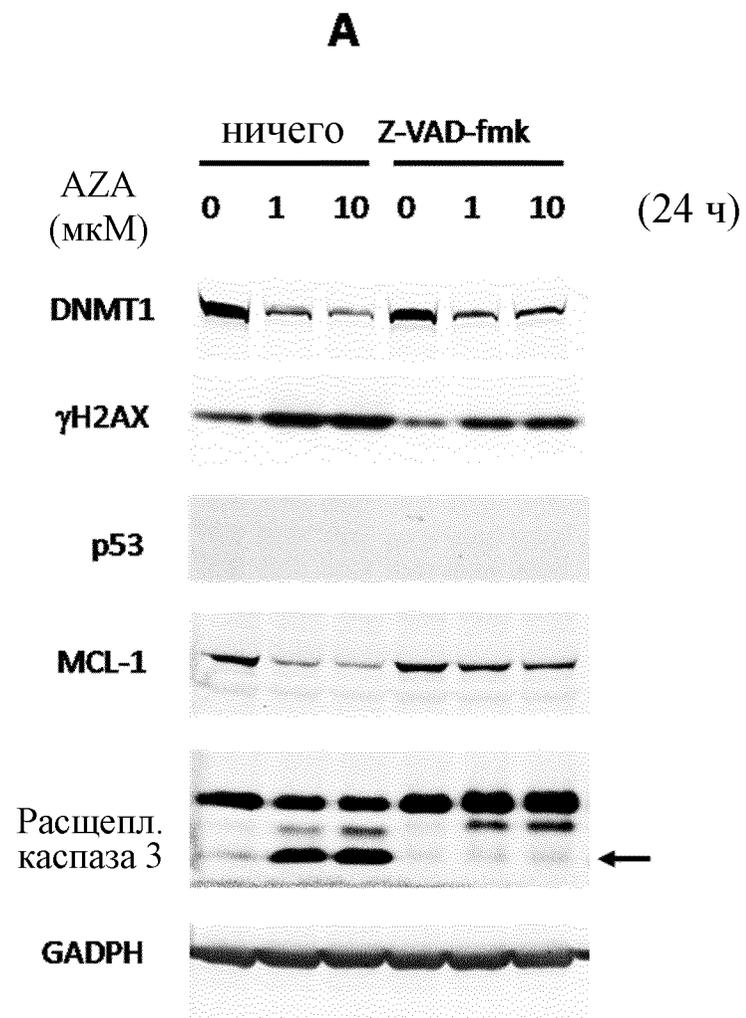
## Клеточные линии AML



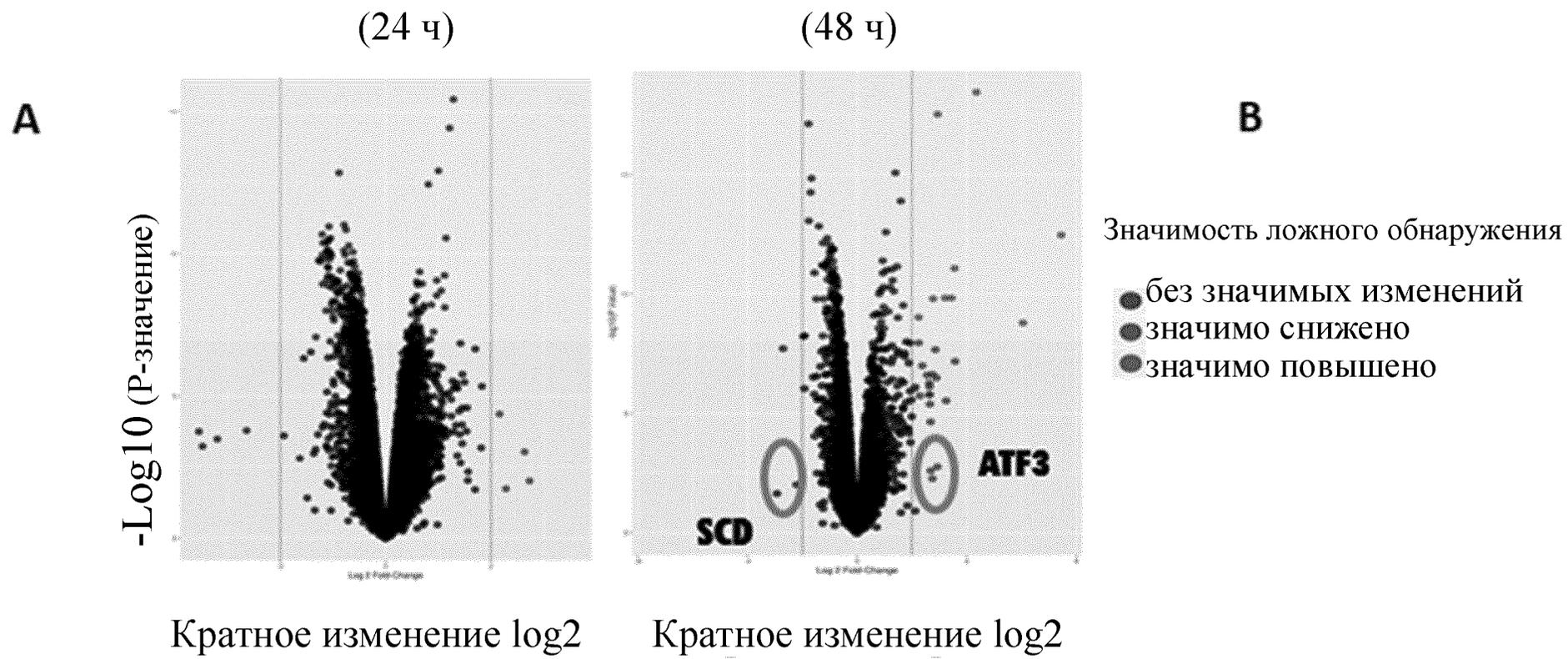
Фиг. 11



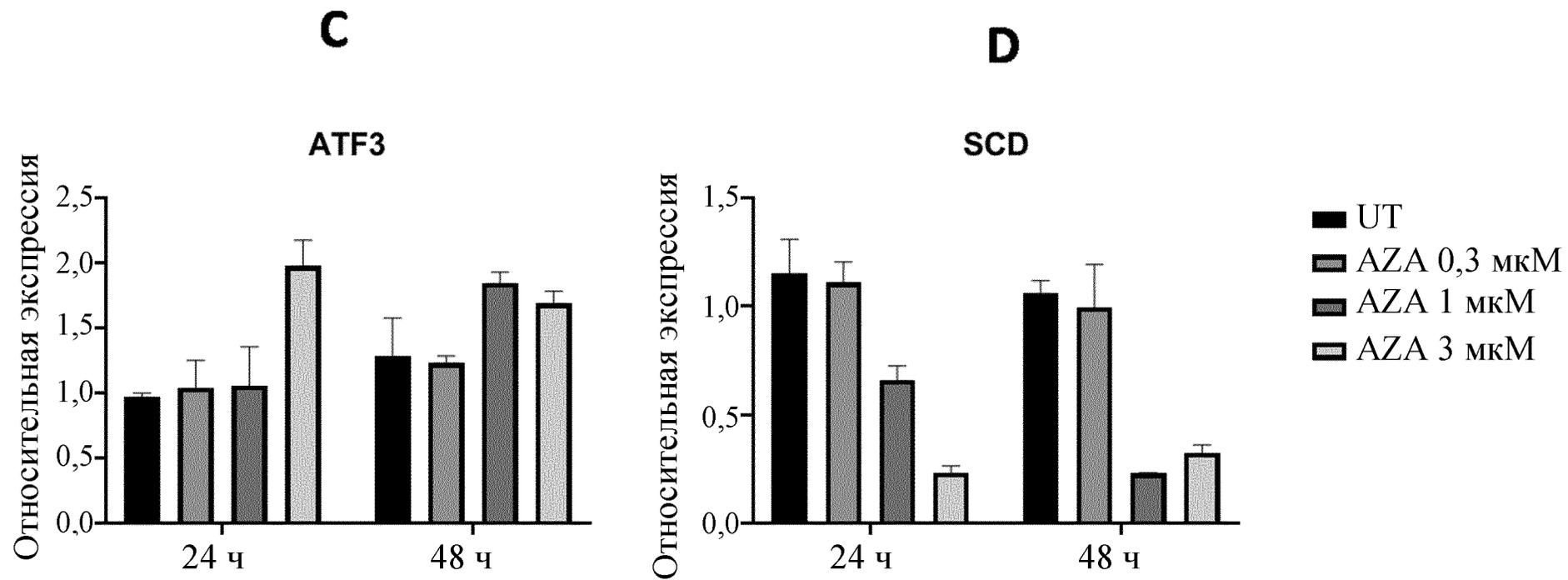
Фиг. 12



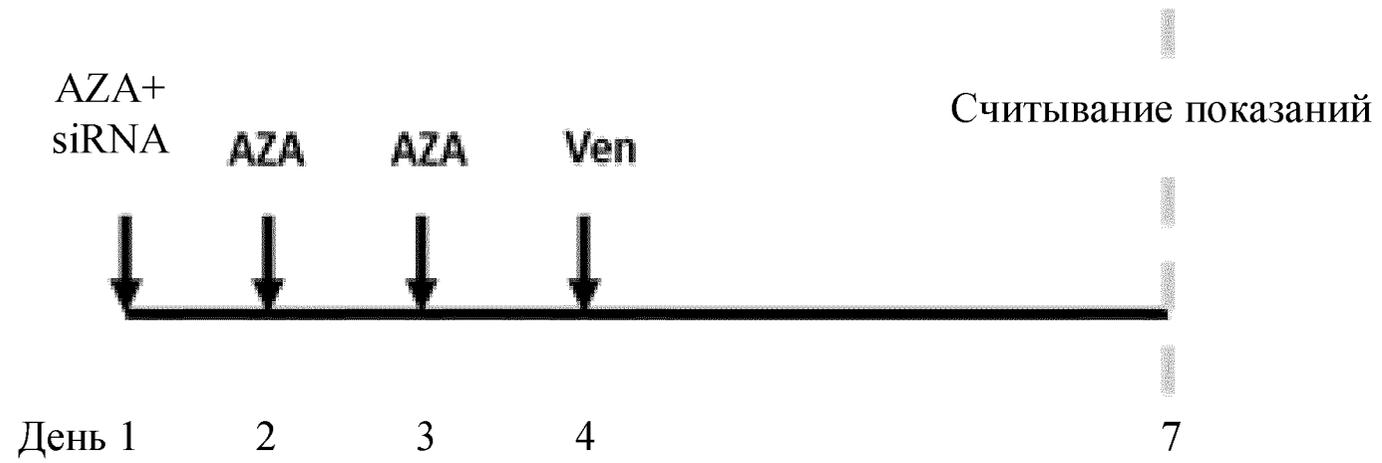
Фиг. 13



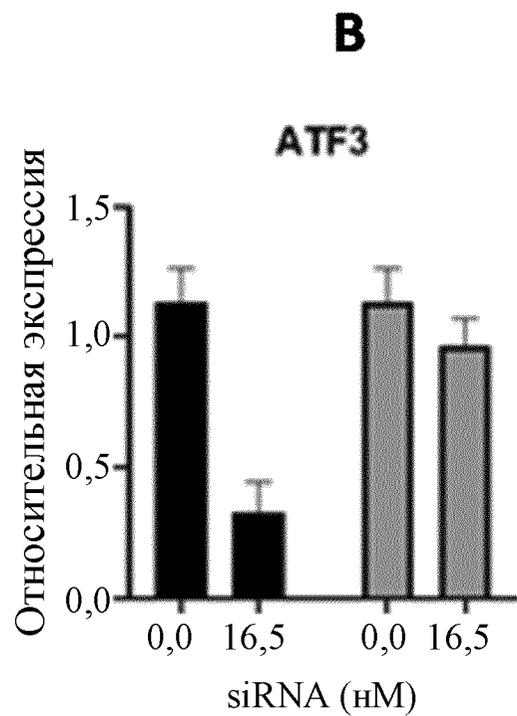
**Фиг. 14**



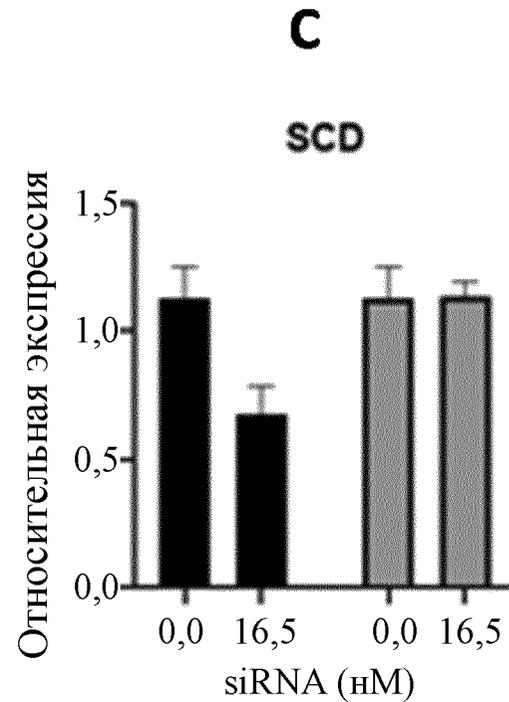
Фиг. 14 (продолжение)



Фиг. 15



■ ATF3  
■ Скремблир.

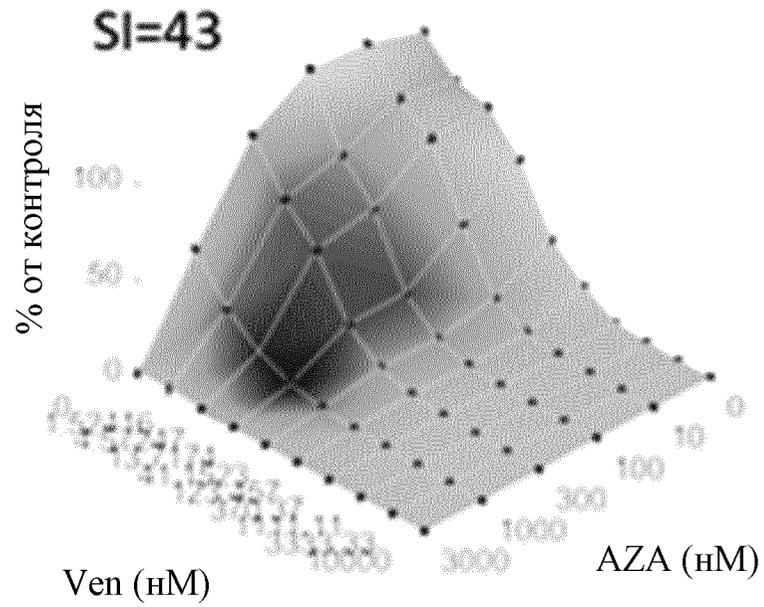


■ ATF3  
■ Скремблир.

**Фиг. 15 (продолжение)**

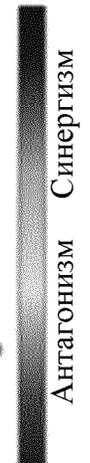
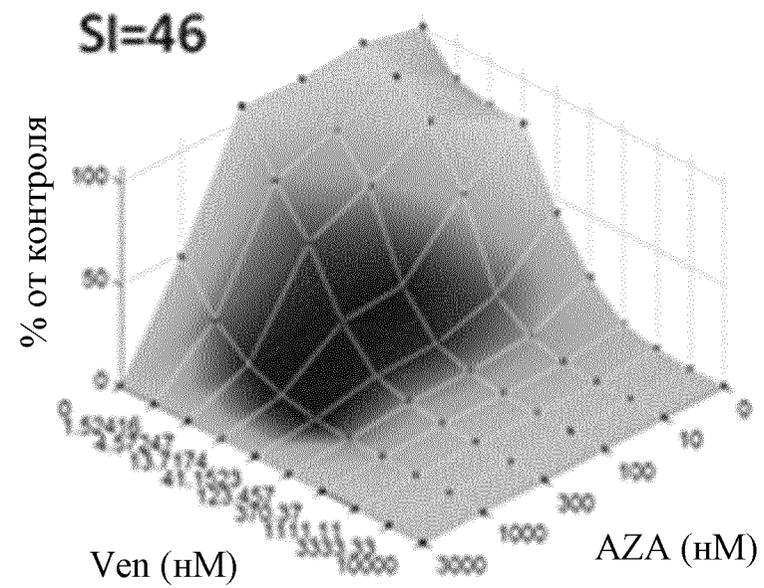
**D**

Нетрансфицированные



**E**

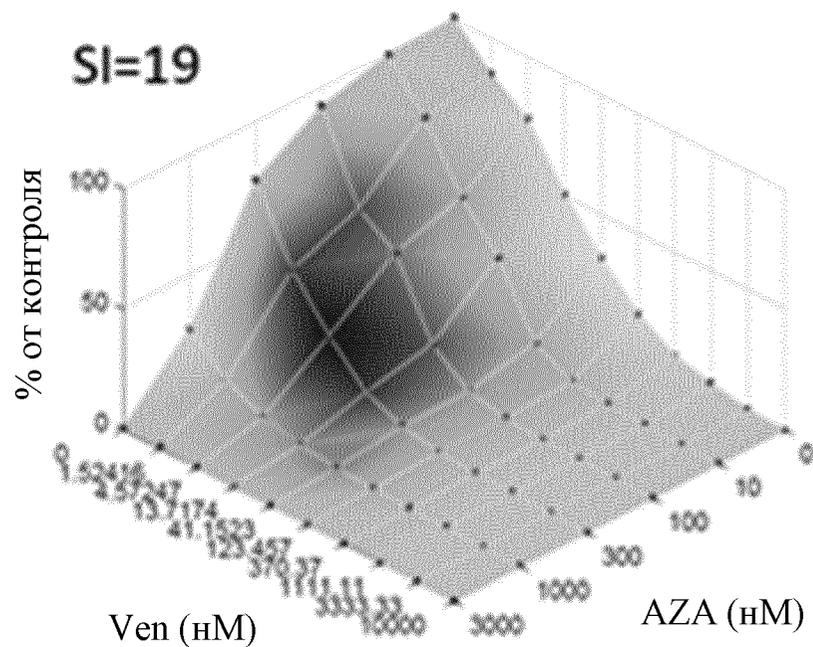
Скремблированная RNAi



**Фиг. 15 (продолжение)**

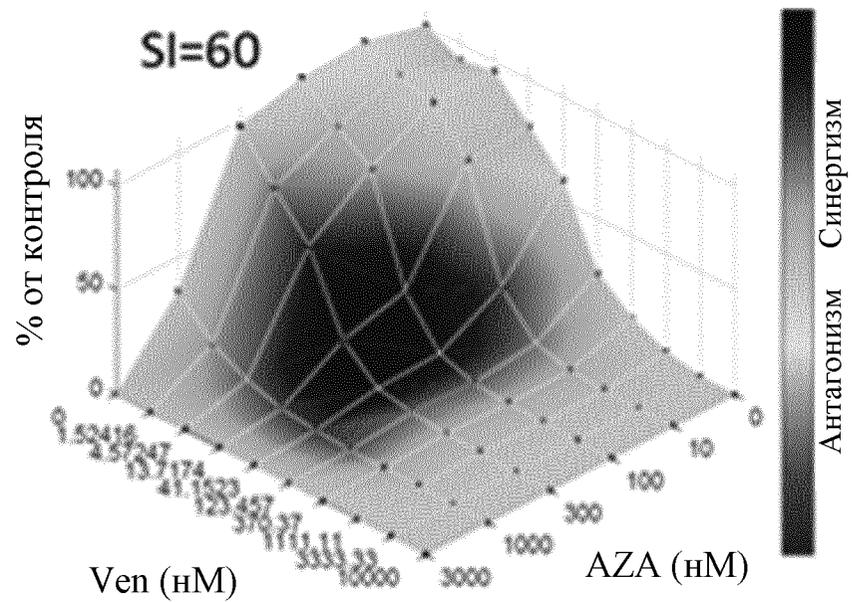
**F**

Нокдаун ATF3



**G**

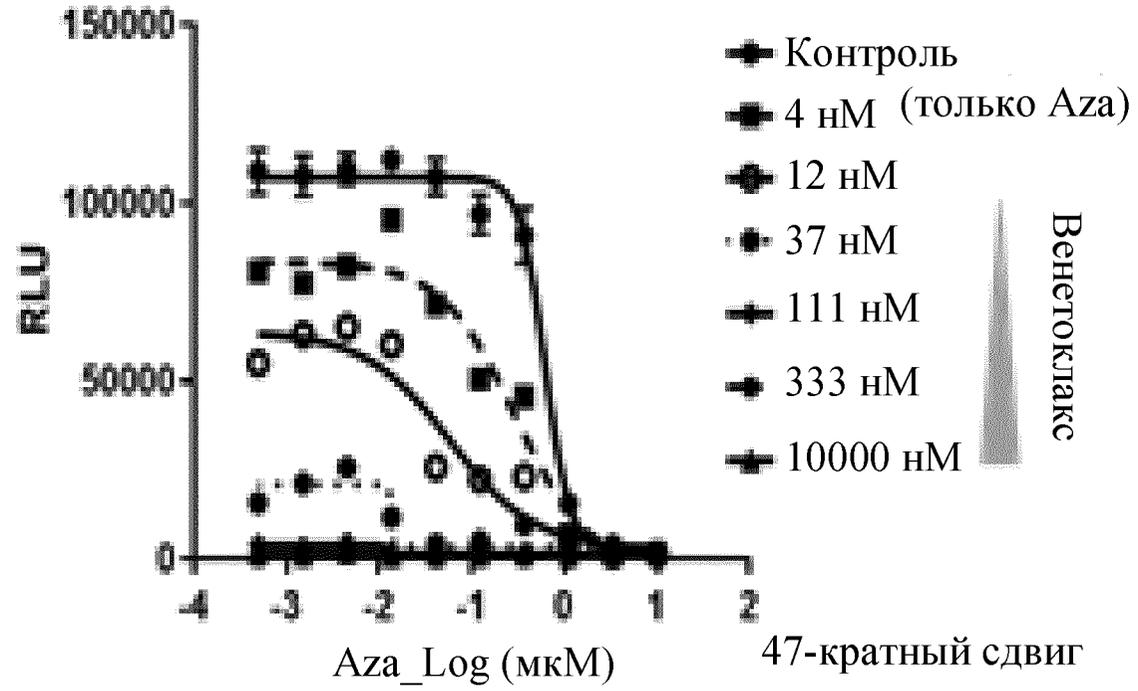
Нокдаун SCD



**Фиг. 15 (продолжение)**

**A**

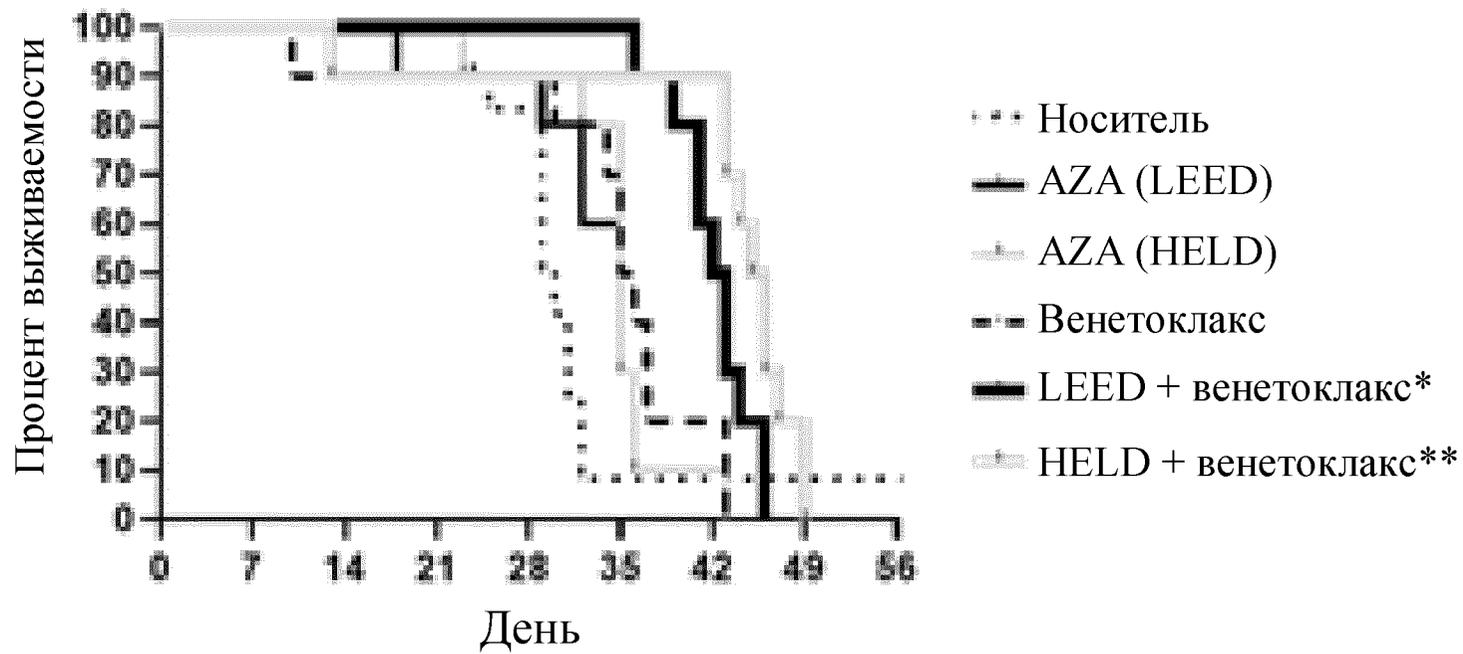
MV4-11



Фиг. 16А



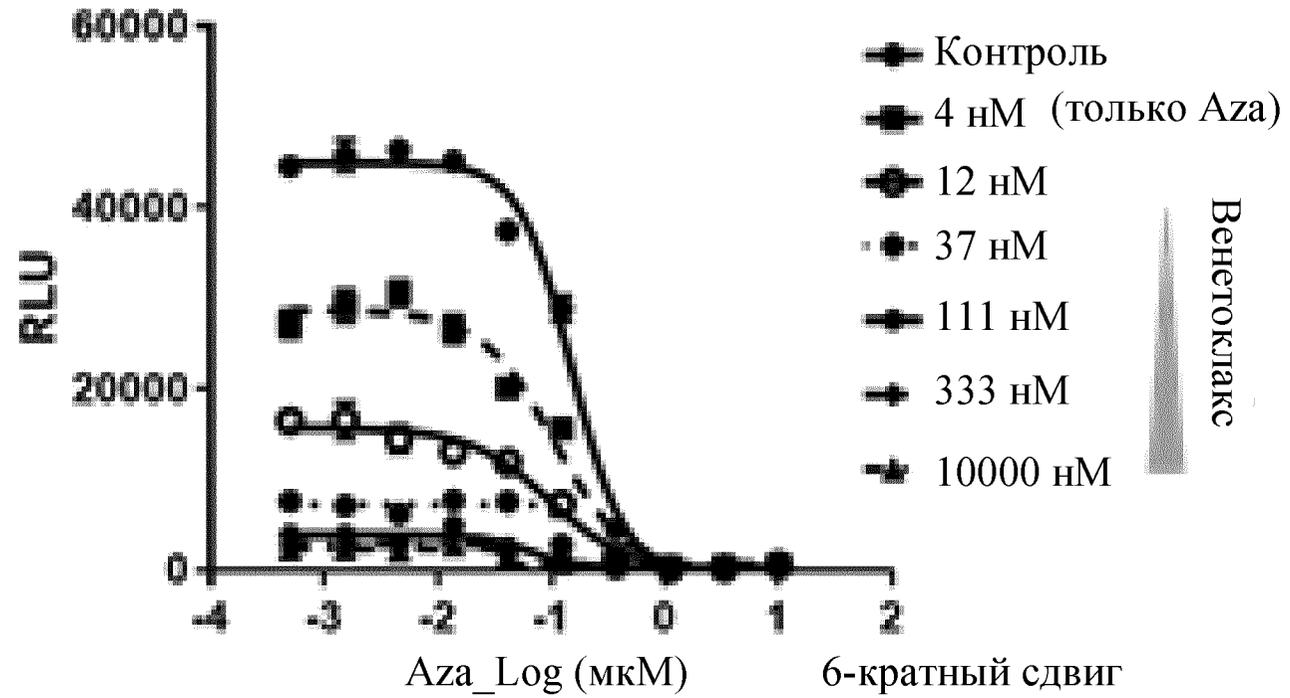
**С**



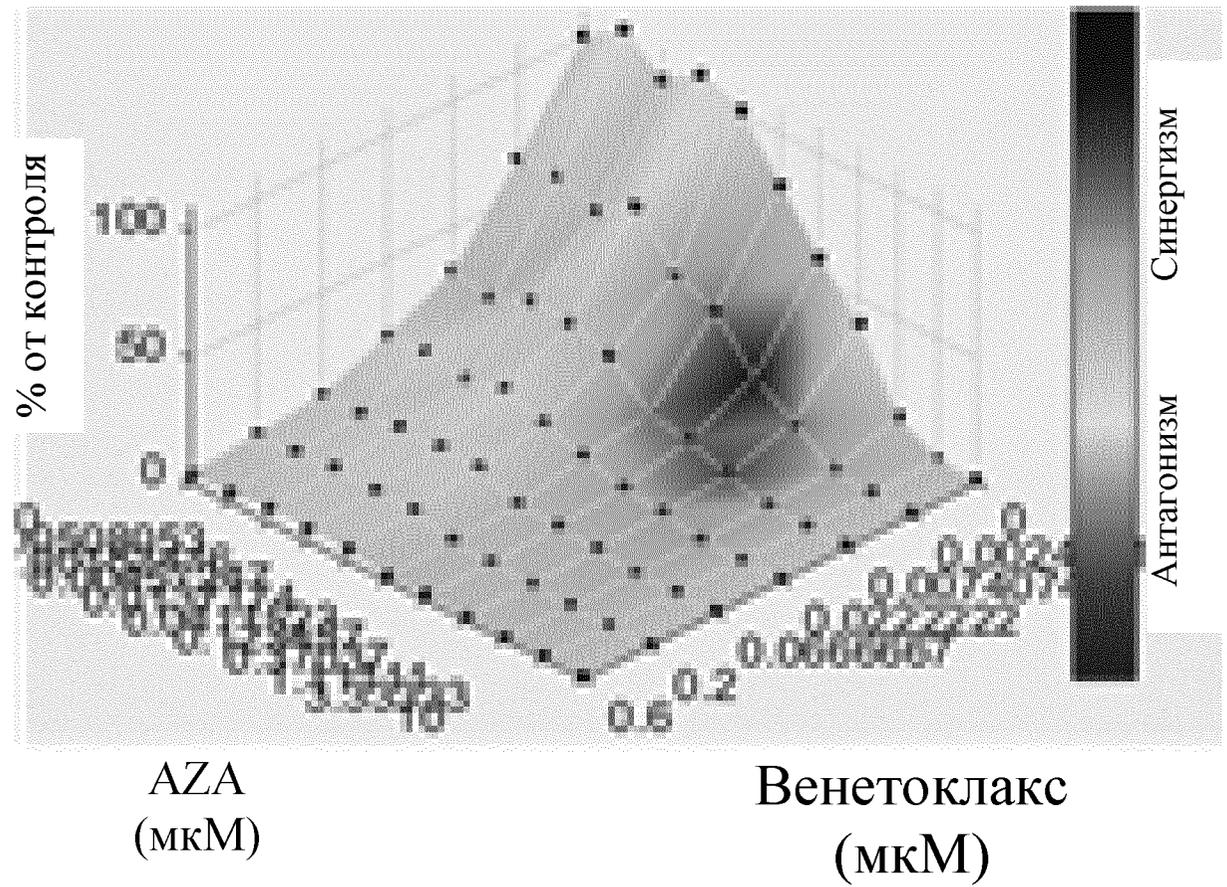
Фиг. 16С

D

MOLM-13

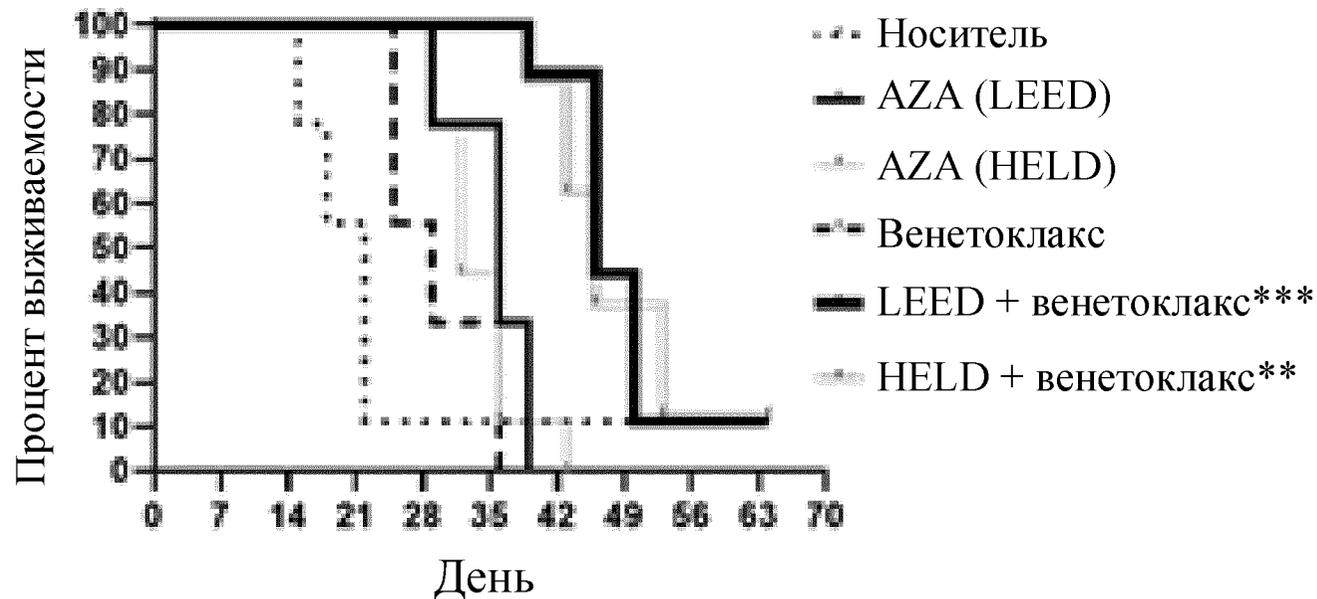


Фиг. 16D



Фиг. 16Е

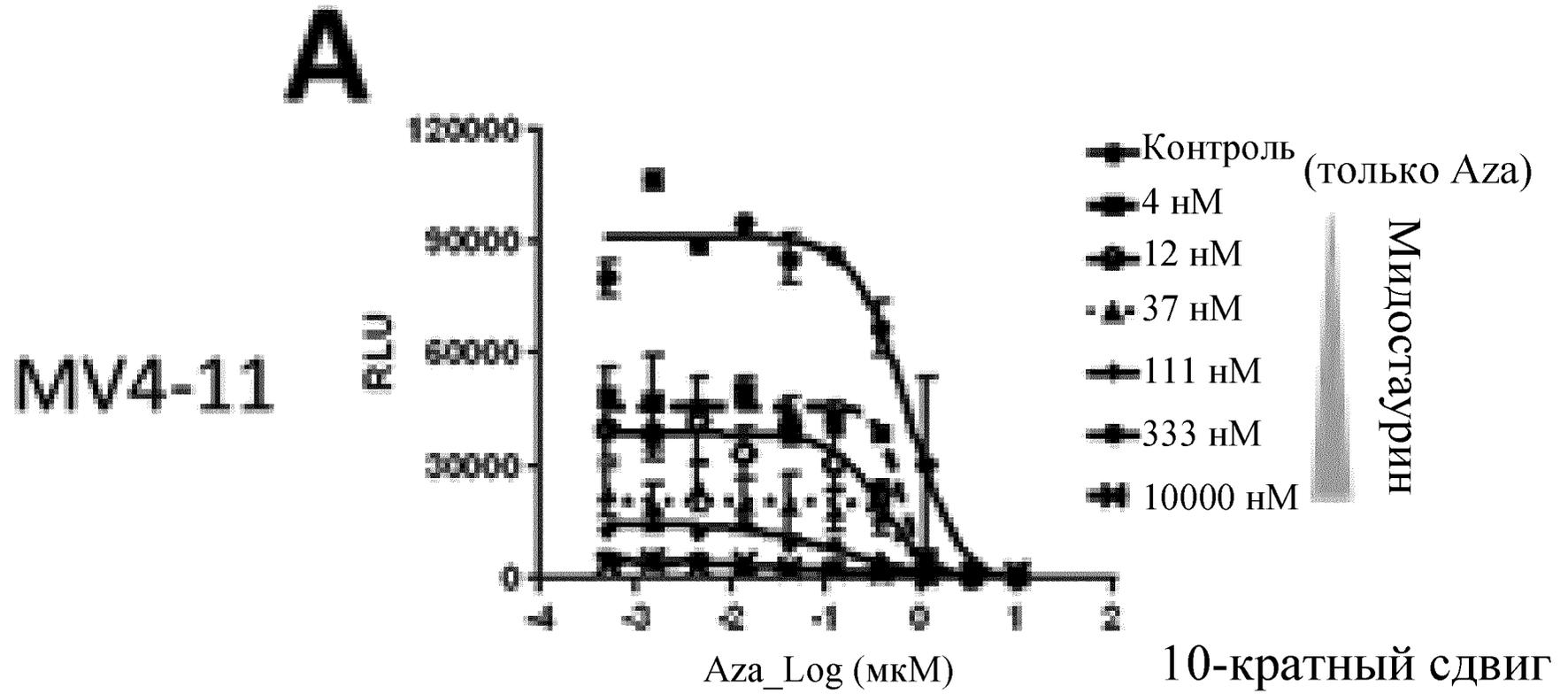
**F**



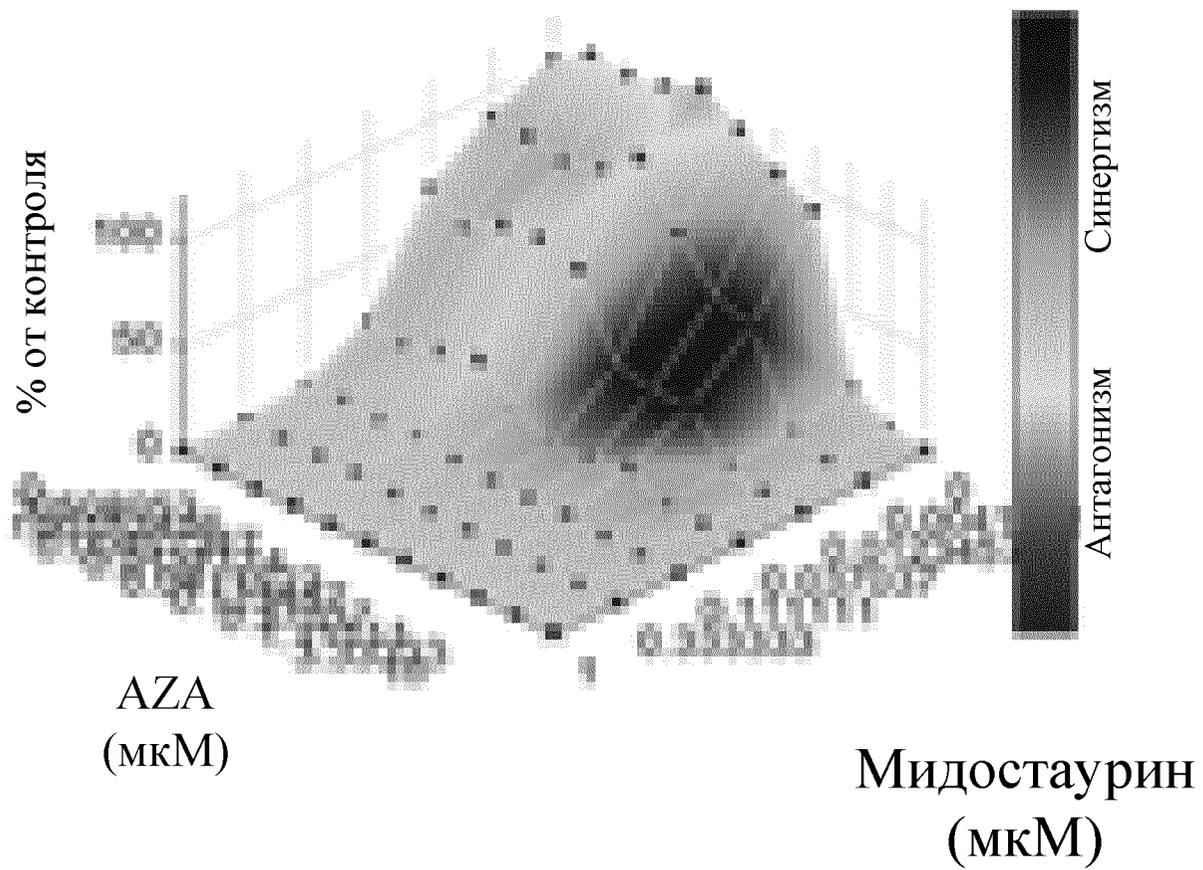
P-значение Мантеля-Кокса (относительно наиболее эффективного отдельного средства)

\*P<0,05; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0001

**Фиг. 16F**

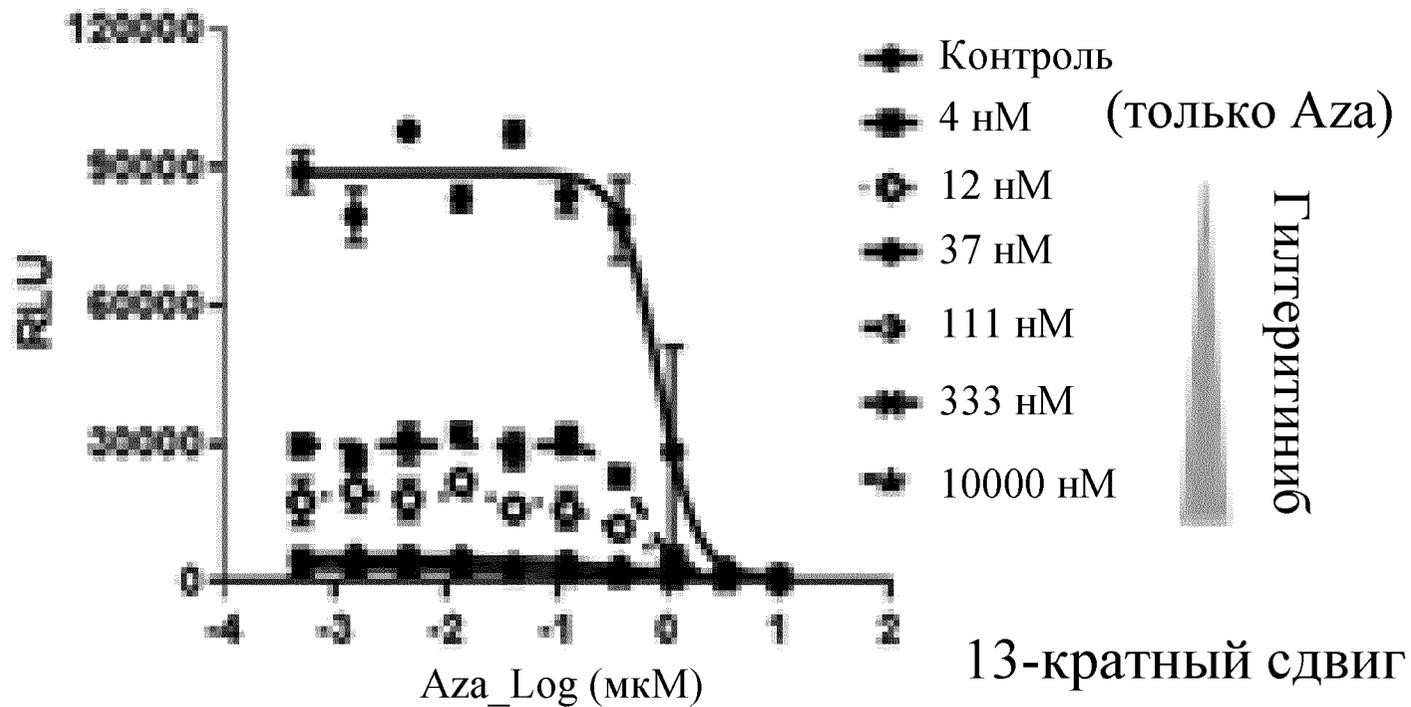


Фиг. 17А

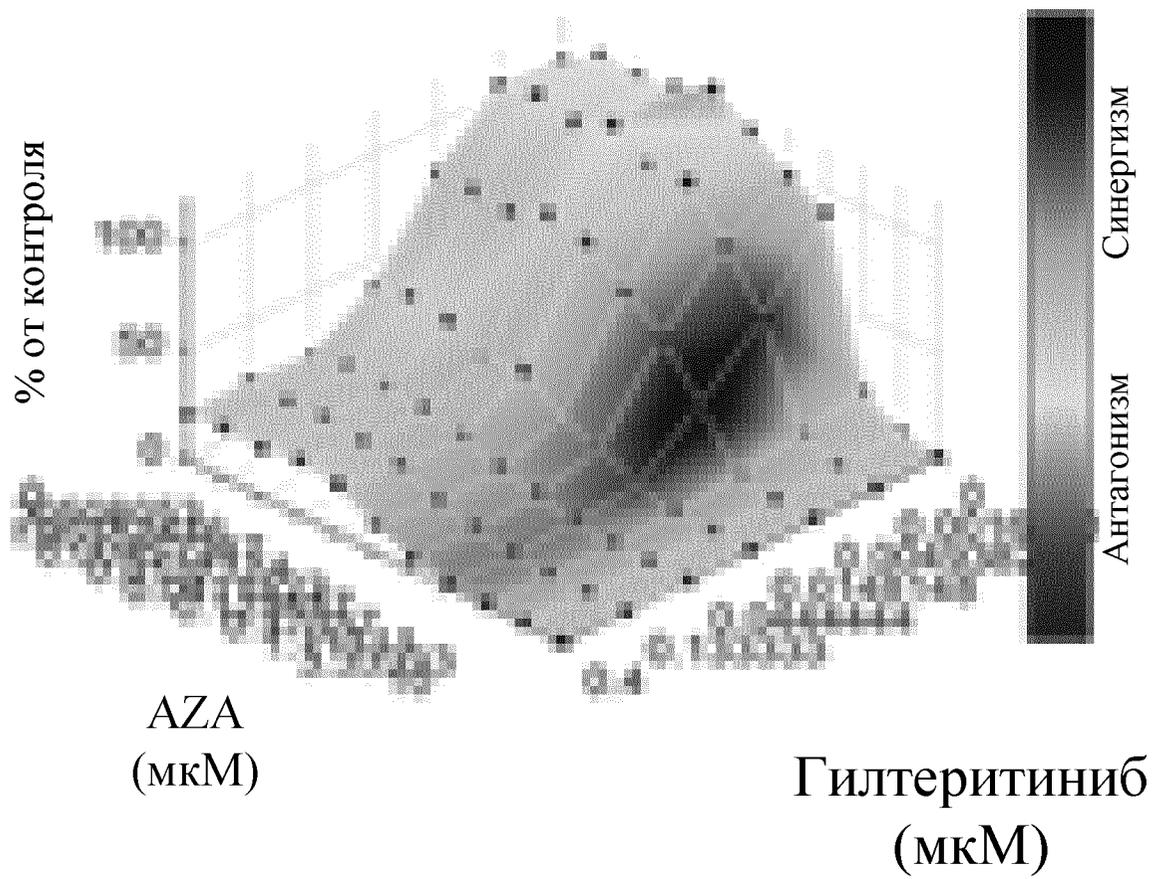


Фиг. 17В

# C

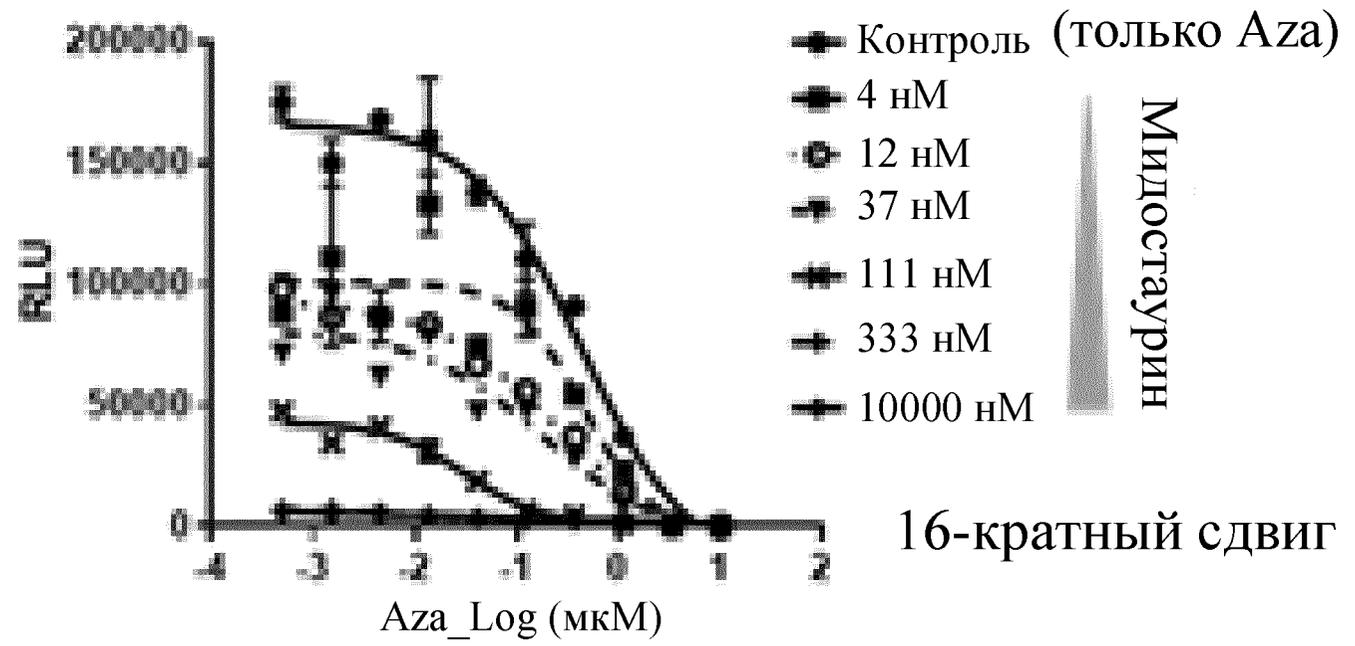


Фиг. 17С

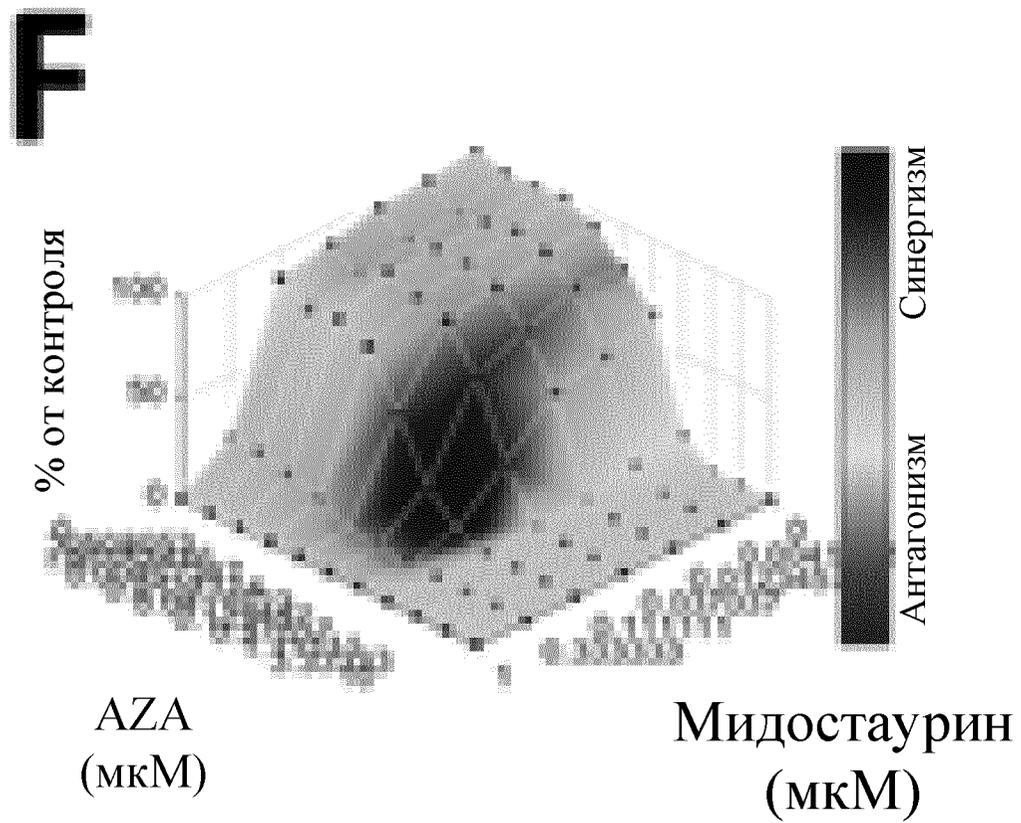


Фиг. 17D

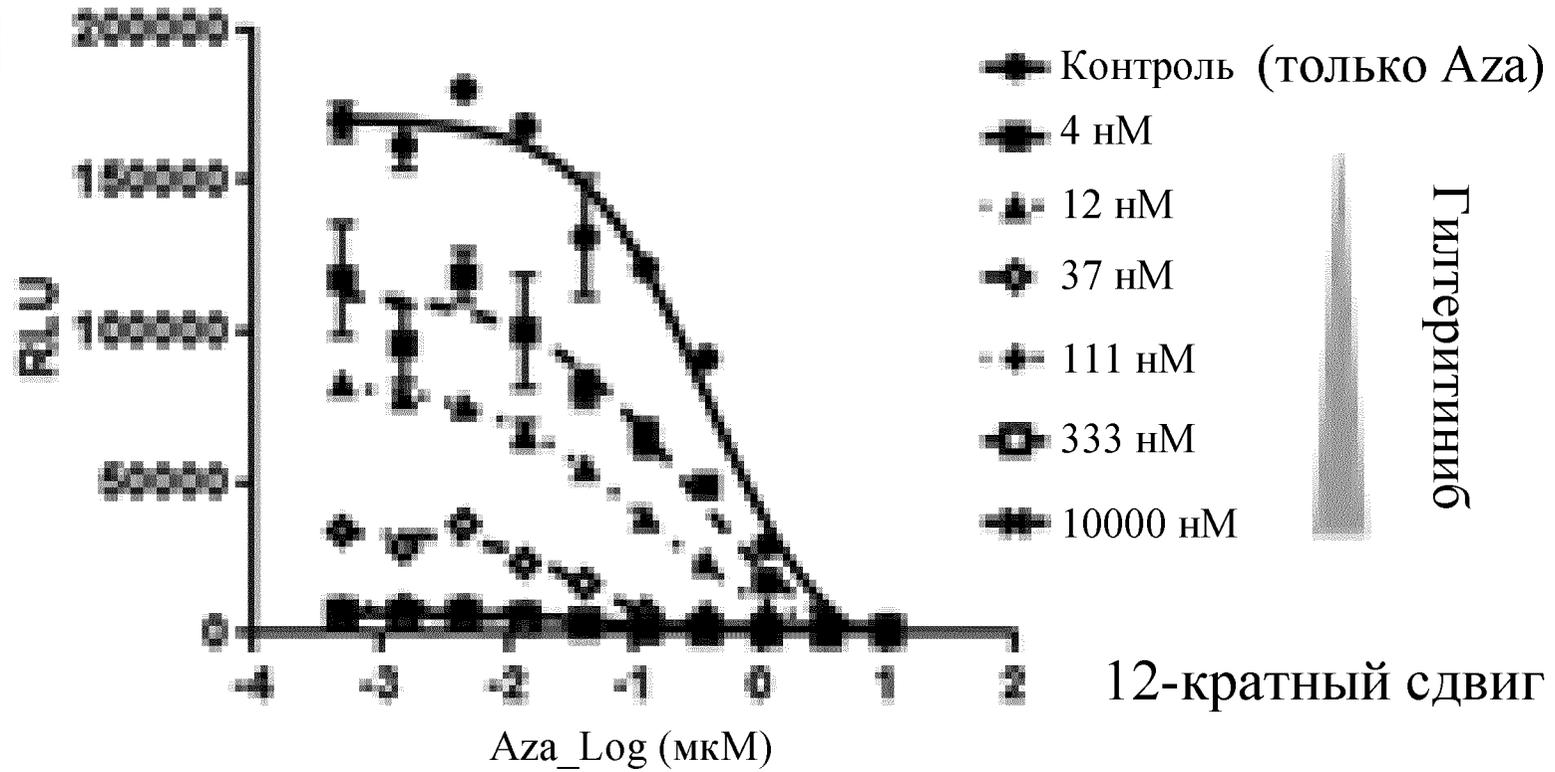
**E**  
**MOLM-13**



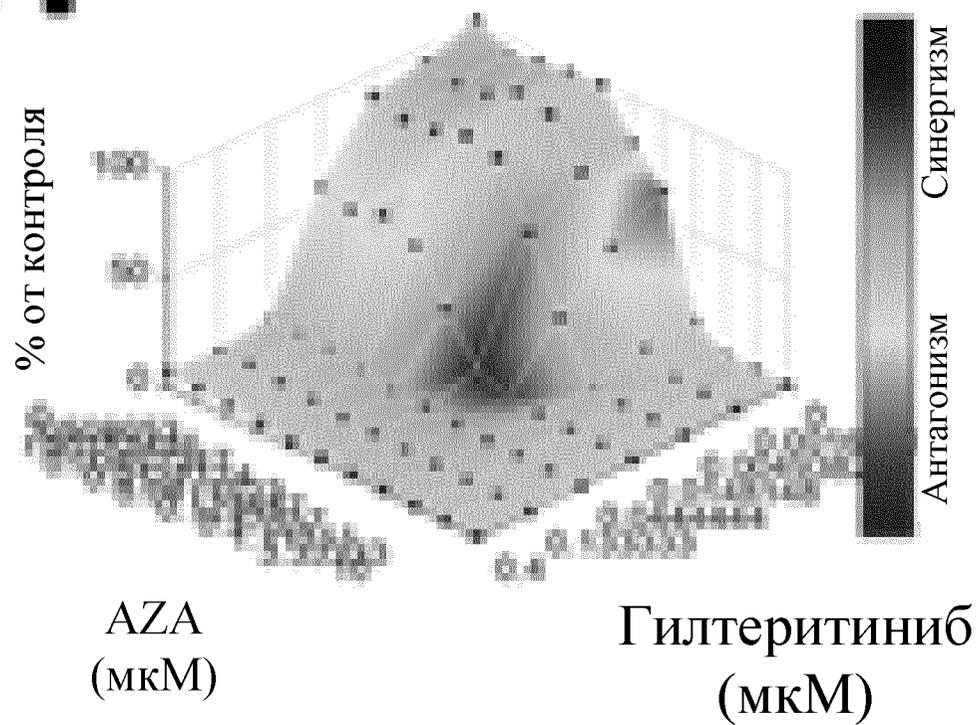
Фиг. 17E



**Фиг. 17F**

**G****Фиг. 17G**

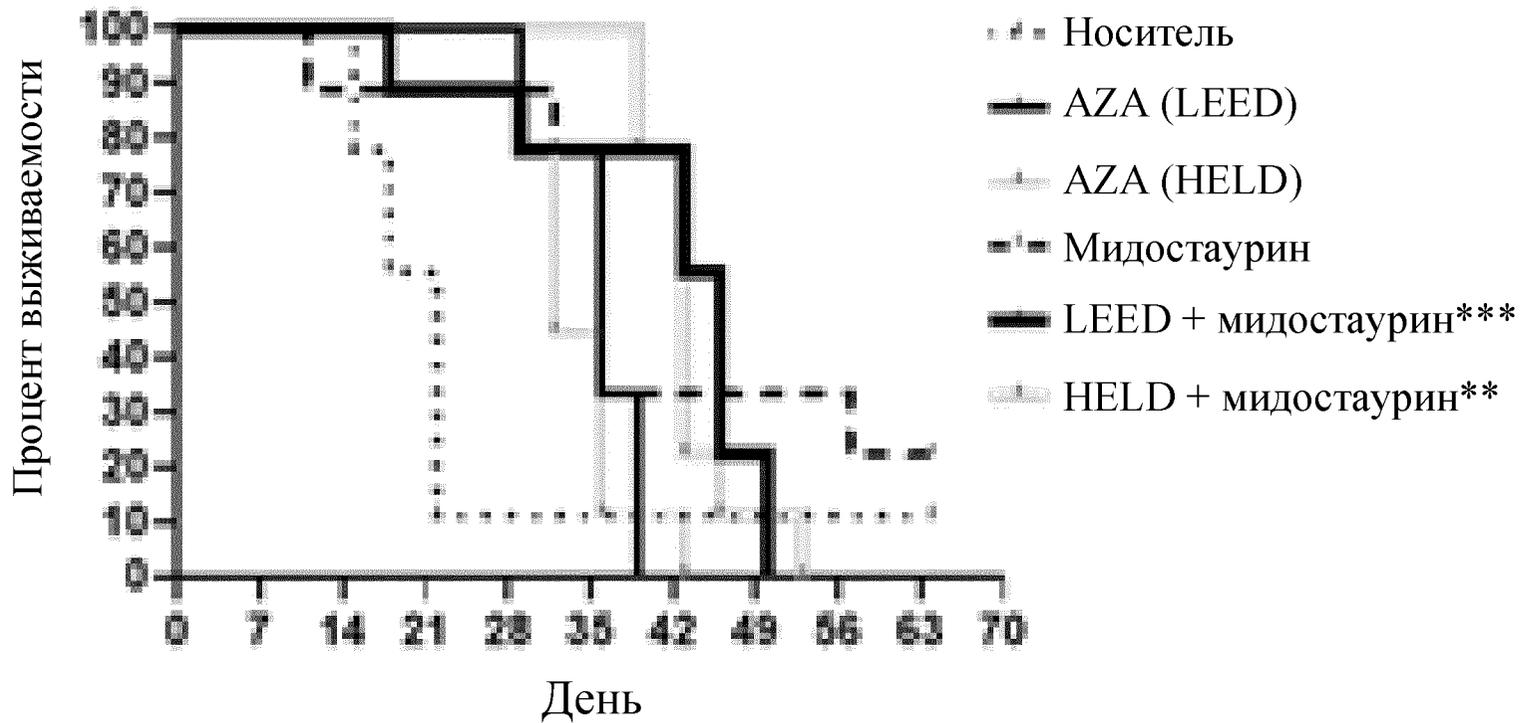
**Н**



**Фиг. 17Н**

# MOLM-13

## Мидостаурин

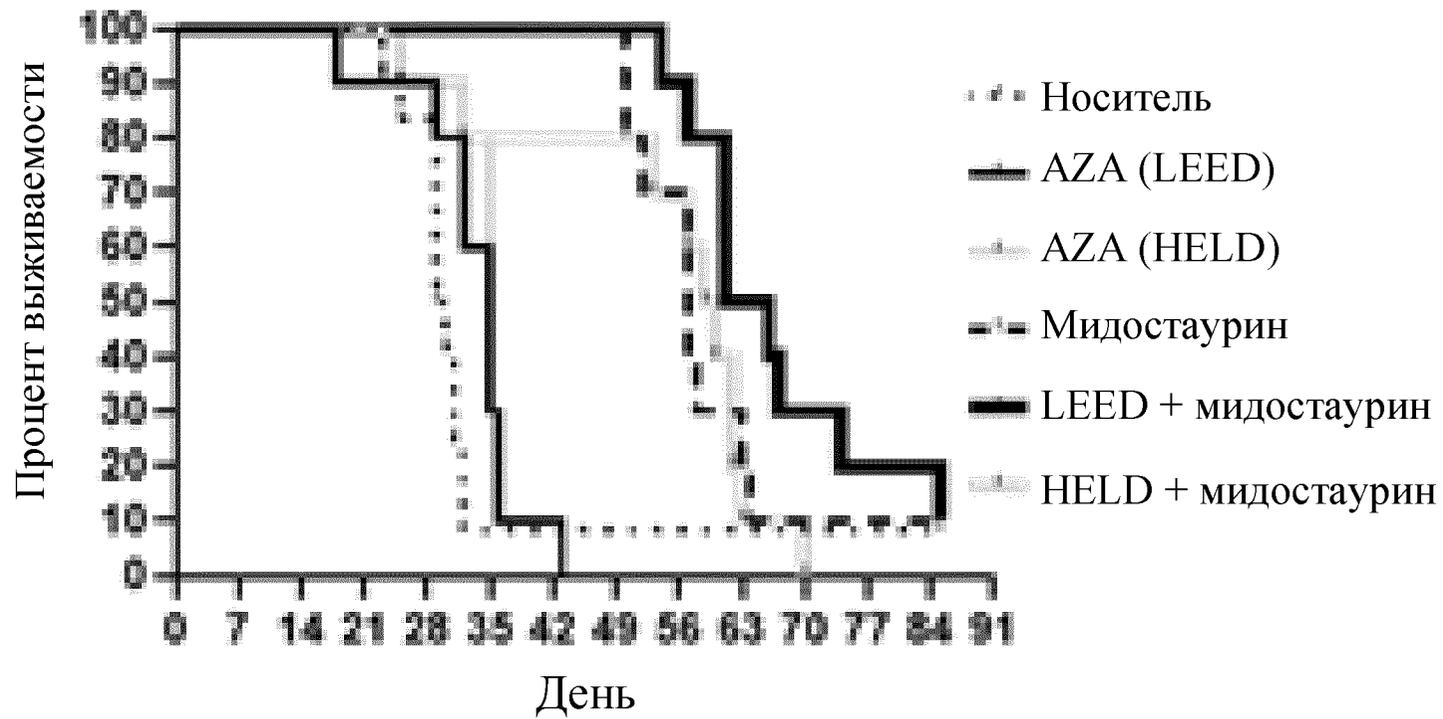


Фиг. 17I

J

# MV4-11

## Мидостаурин

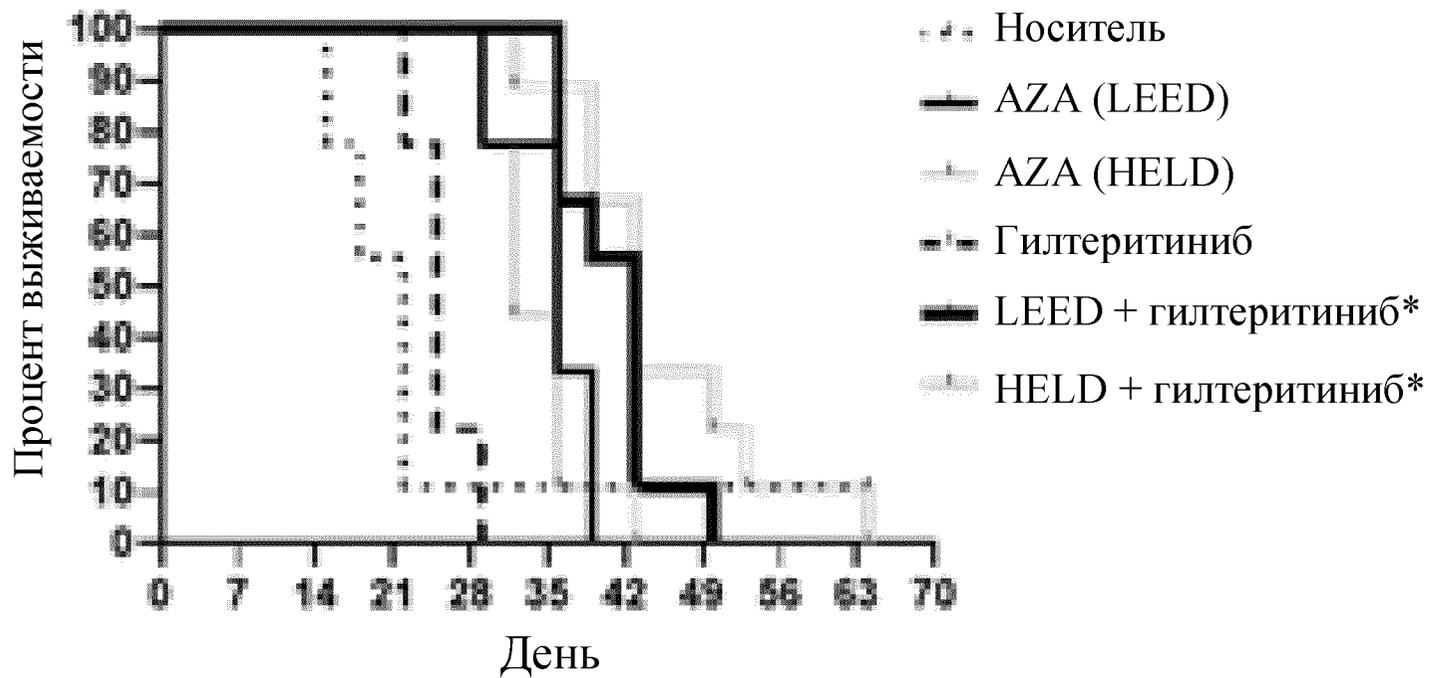


Фиг. 17J

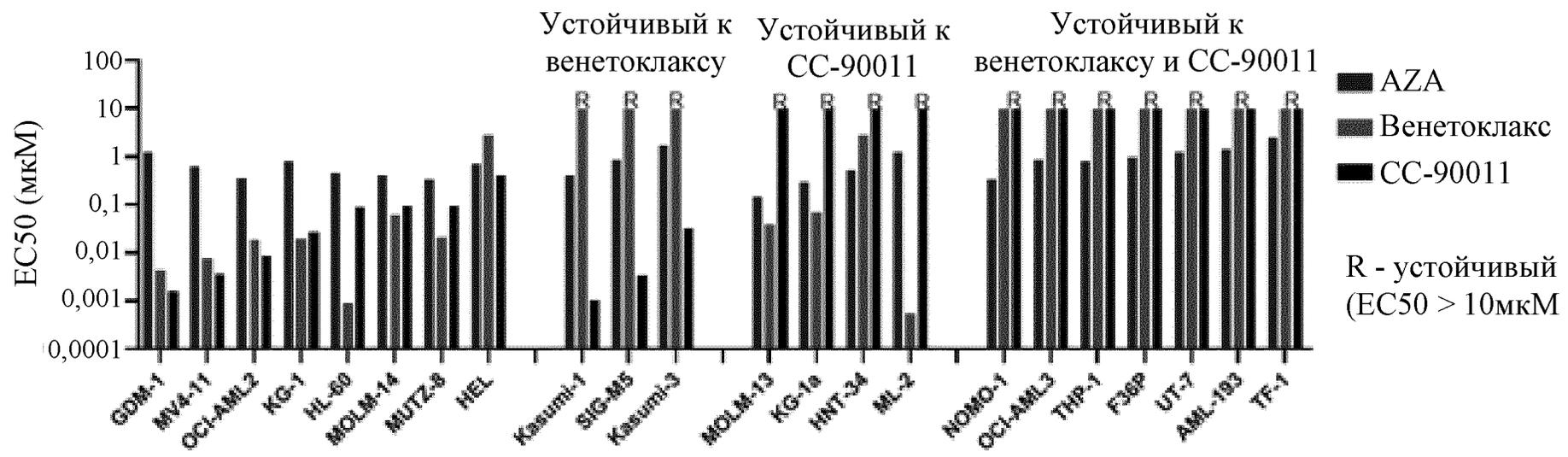
**К**

# MOLM-13

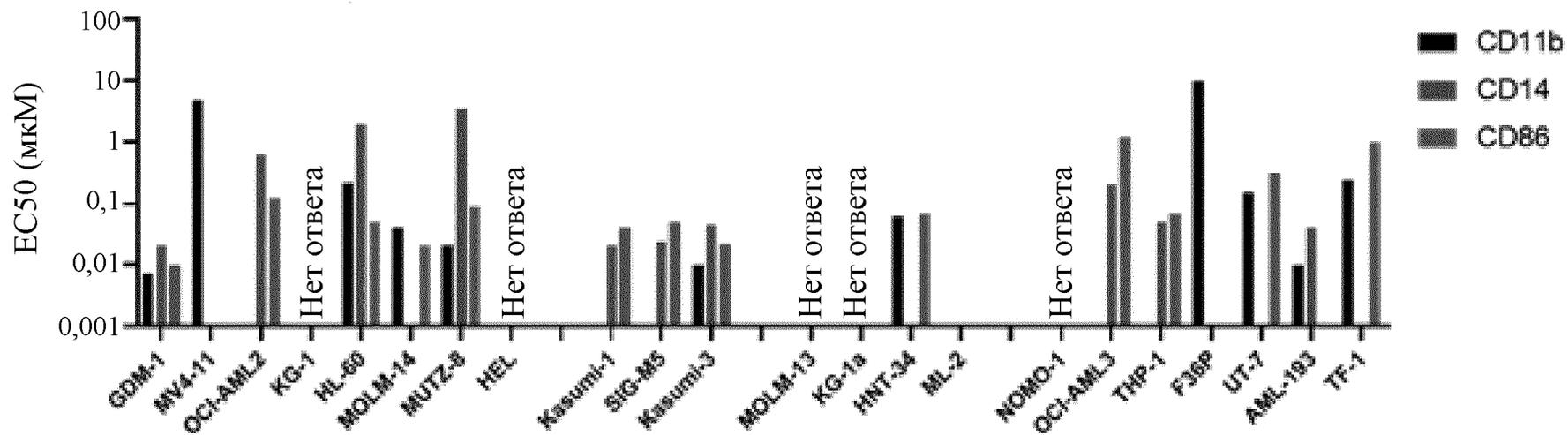
## Гилтеритиниб



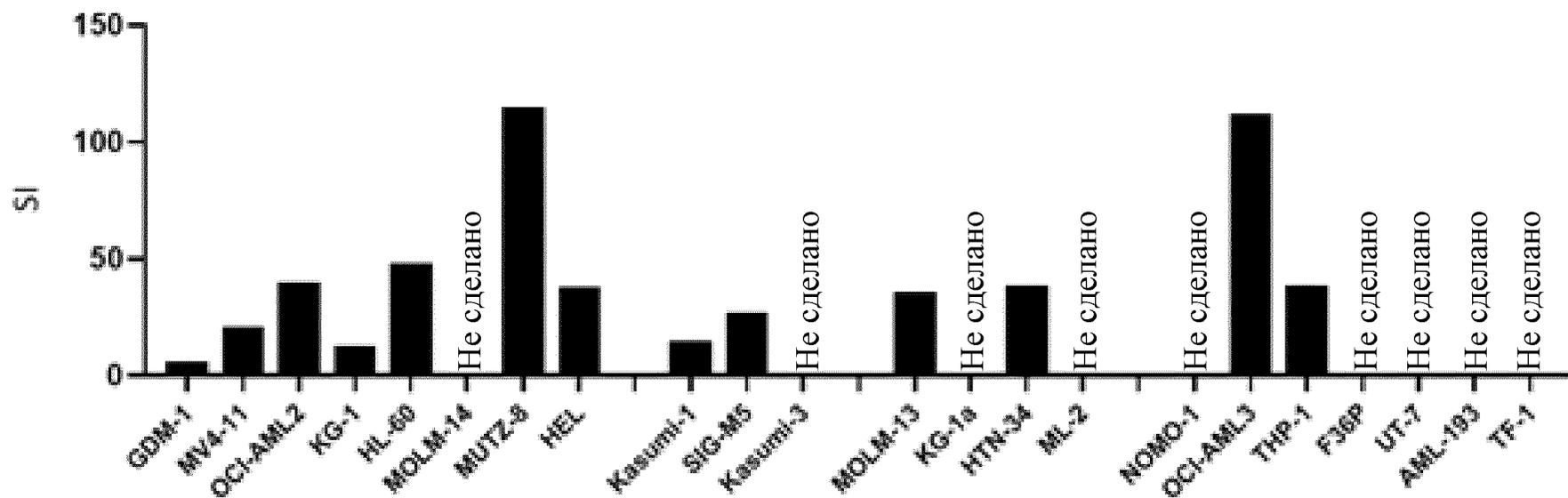
Фиг. 17К



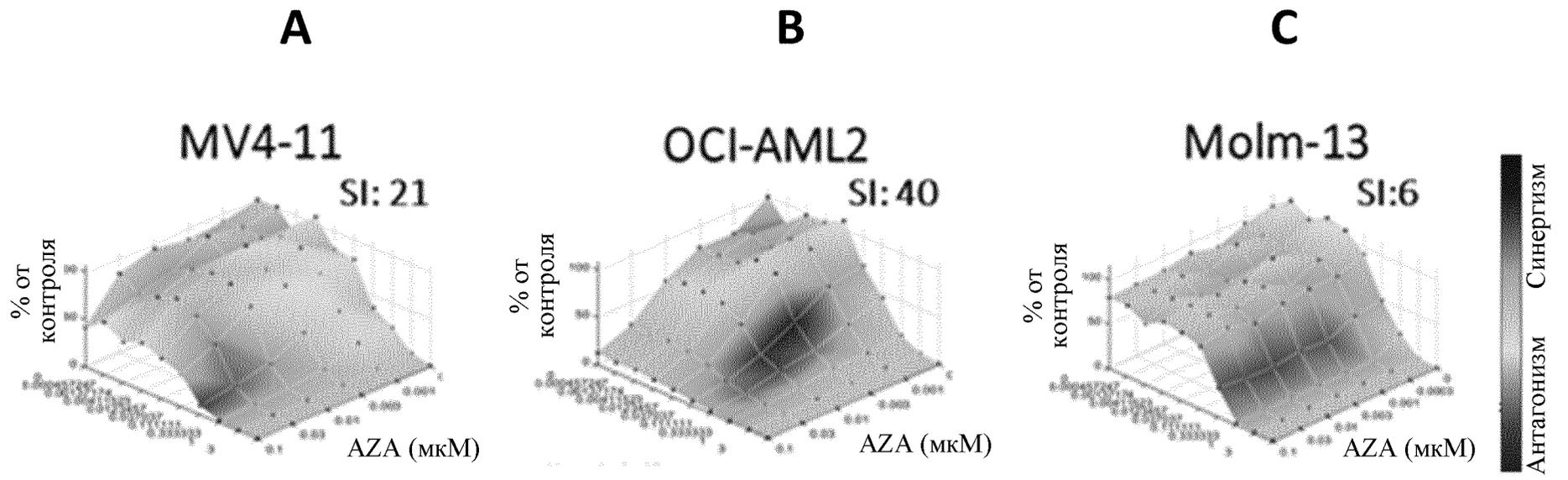
Фиг. 18А



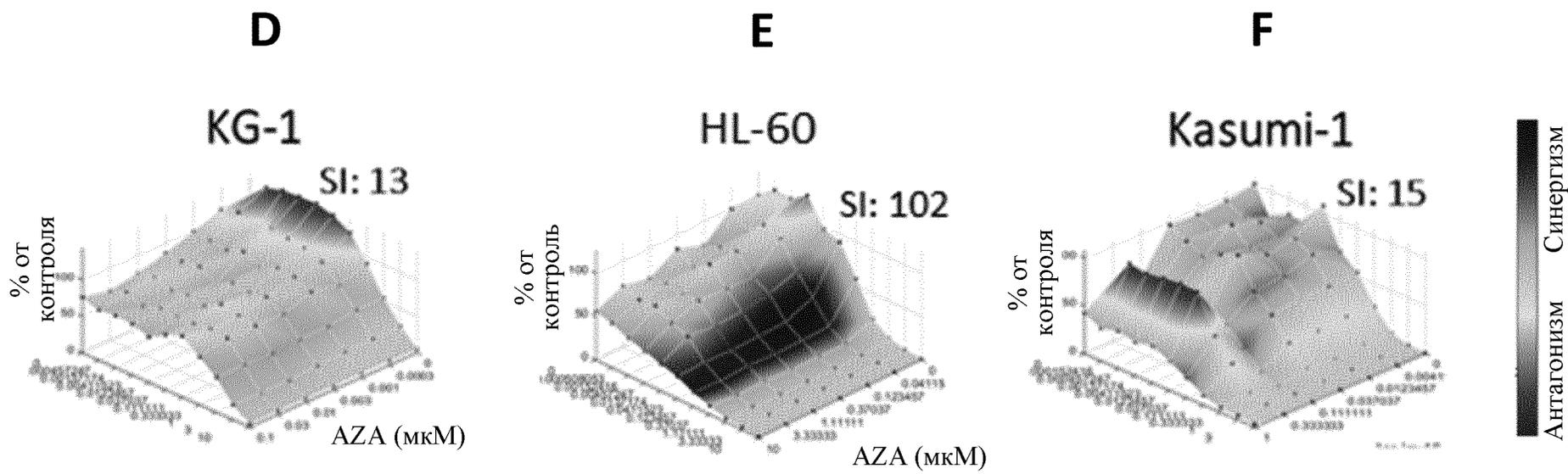
Фиг. 18В



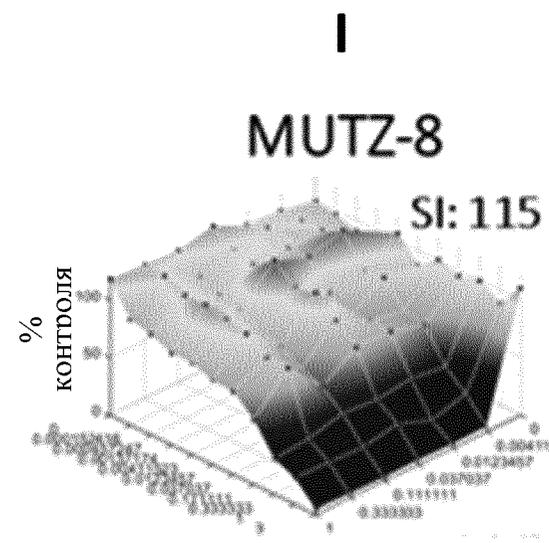
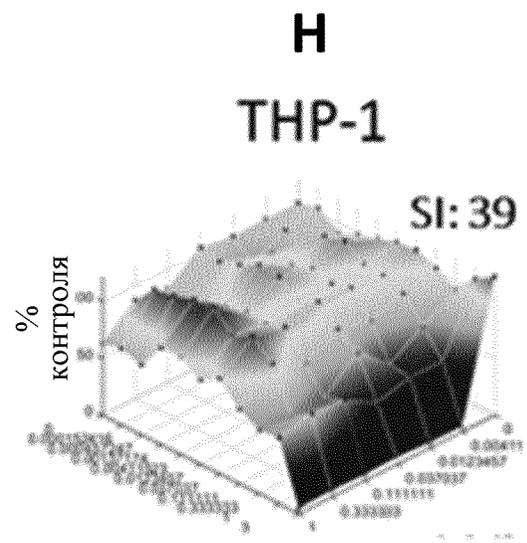
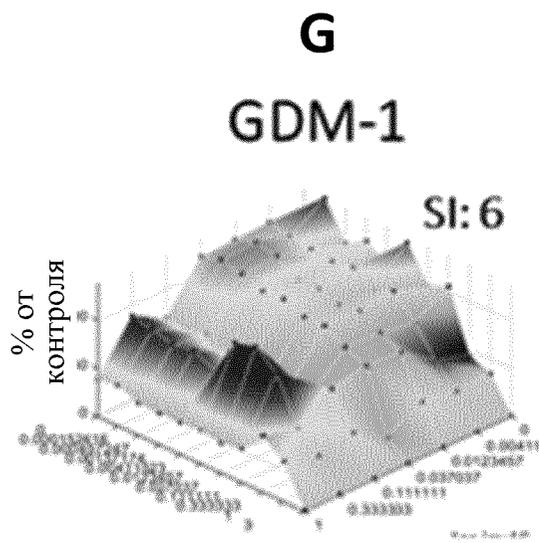
Фиг. 18С



**Фиг. 19**

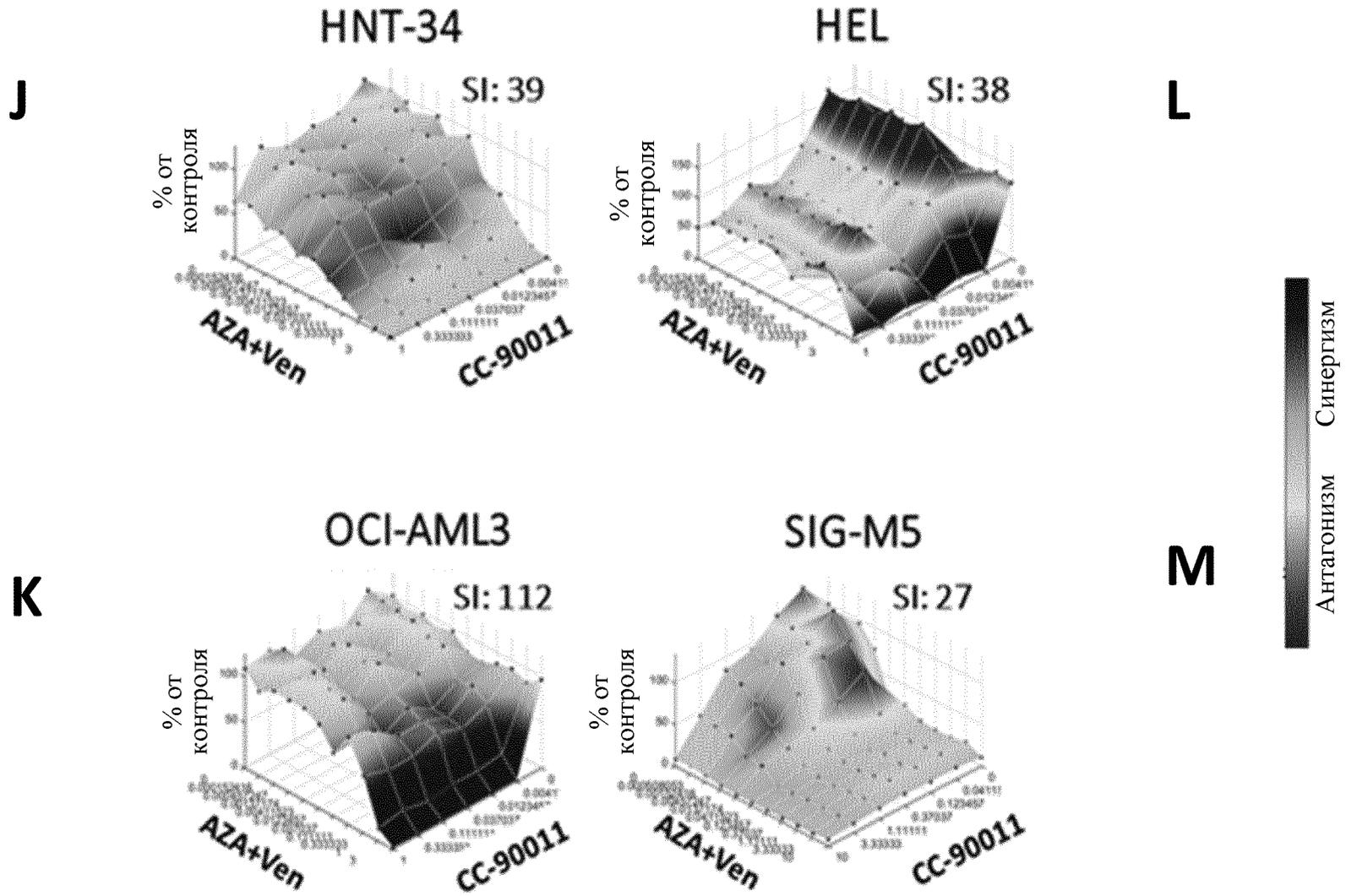


**Фиг. 19 (продолжение)**



Антагонизм  
Синергизм

**Фиг. 19 (продолжение)**

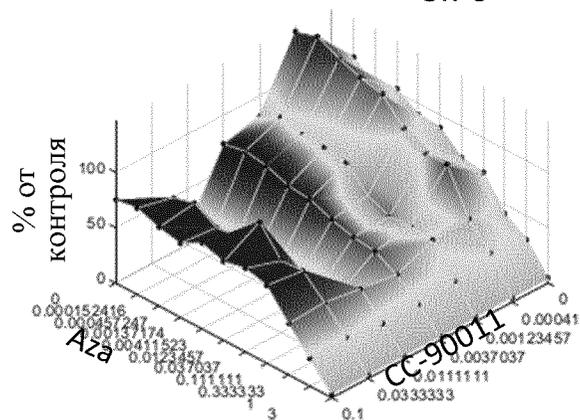


Фиг. 19 (продолжение)

**A**

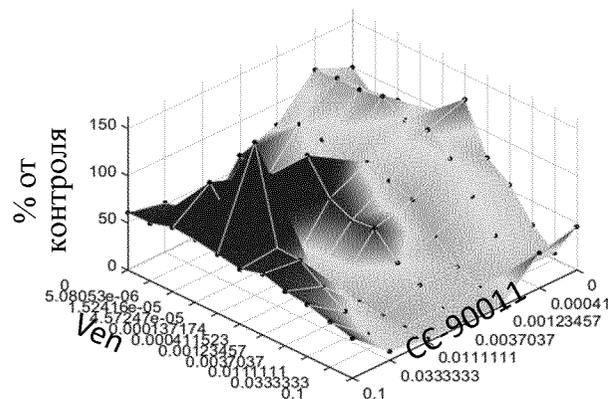
AZA против CC-90011

SI: 6

**B**

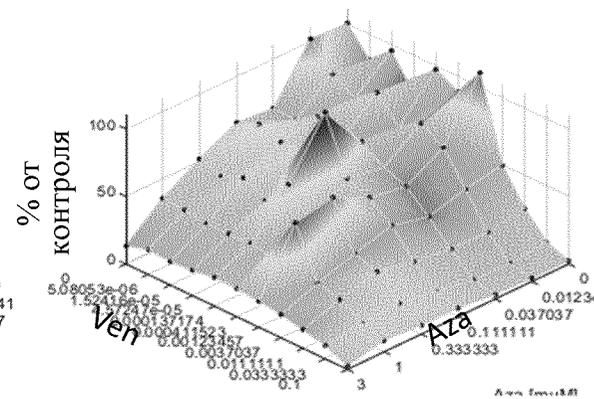
Ven против CC-90011

SI: 6

**C**

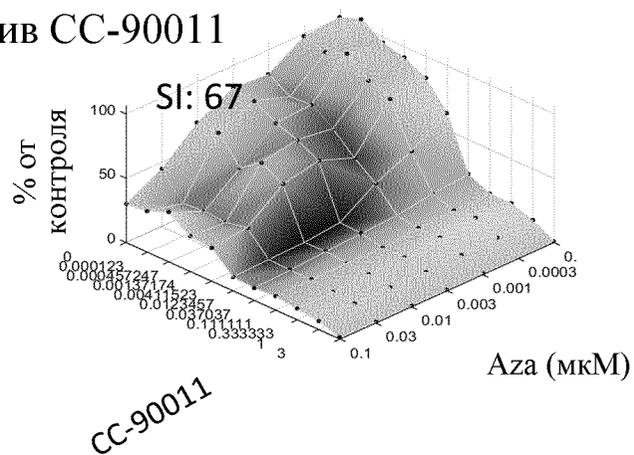
Ven против AZA

SI: 18

**D**

AZA+Ven против CC-90011

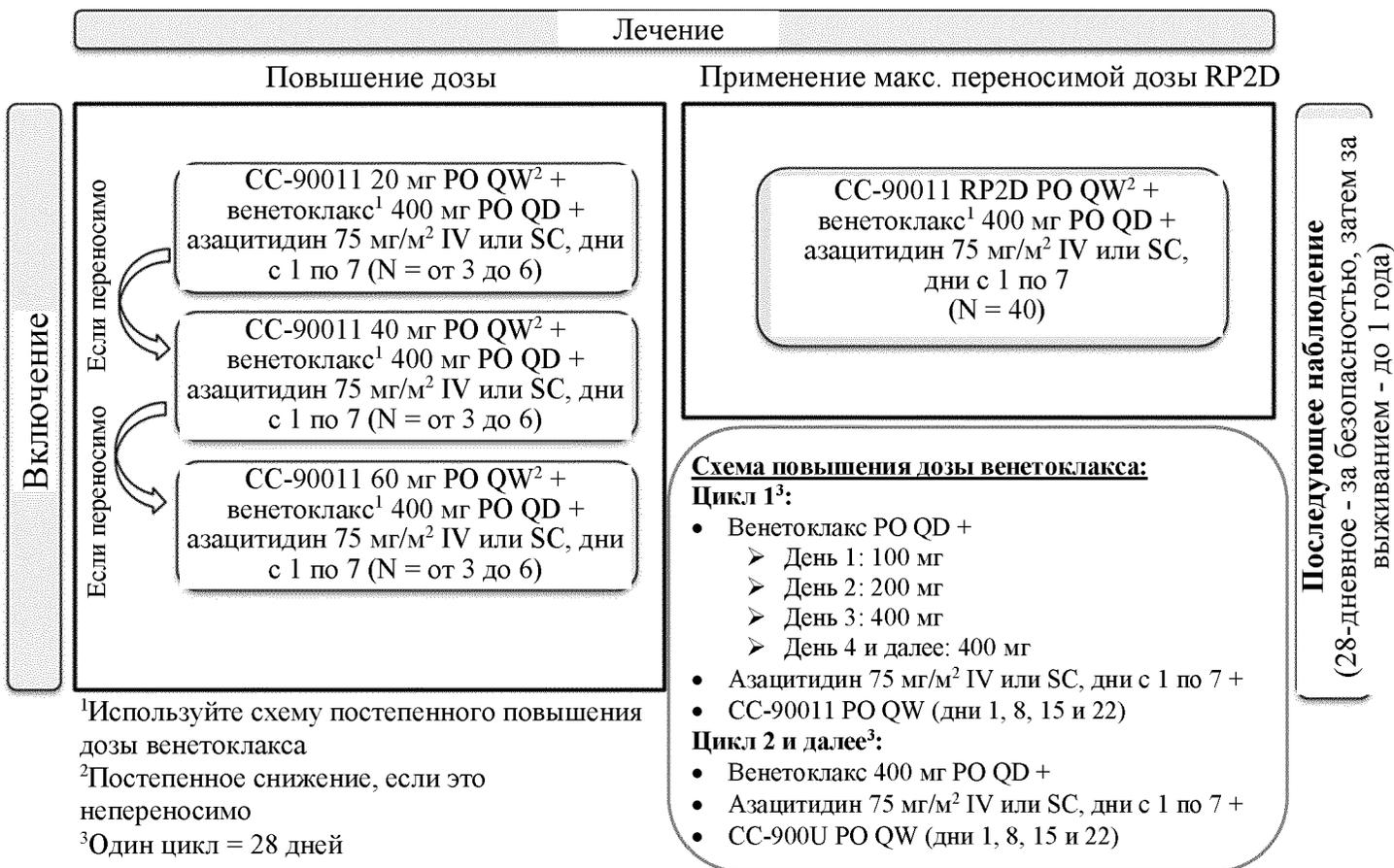
SI: 67



Фиг. 20

Скрининг (от -28 до -1)  
**КЛЮЧЕВЫЕ** критерии приемлемости

- Нелеченный АМЛ
- IC-неприемлемость ( $\geq 75$  лет или  $\geq 60-74$  лет с сопутствующими заболеваниями)
- Исключить субъектов, которые могут получать терапию FLT-3m или иметь APL.



**Фиг. 21**