

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291310 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.15

(22) Дата подачи заявки
2020.10.27

(51) Int. Cl. *A61K 31/454* (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЗА И ПРИМЕНЕНИЕ СИГНАТУРЫ ЛЕЙКОЗНОЙ
СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ ДЛЯ ПРОГНОЗА КЛИНИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
ТЕРАПИЯМ

(31) 62/927,052

(32) 2019.10.28

(33) US

(86) PCT/US2020/057483

(87) WO 2021/086829 2021.05.06

(71) Заявитель:
СЕЛДЖЕН КОРПОРЕЙШН (US)

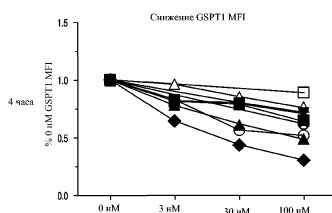
(72) Изобретатель:

Поурдехнад Майкл, Макбет Кайл
Джеймс, Пирс Дэниэл Вестон (US),
Лоос Ремко Жерар (ES), Фань
Цзиньхун (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам применения определенных биомаркеров, таких как наборы генов (например, сигнатура лейкозной стволовой клетки (LSC)) для прогноза и контроля клинической чувствительности к определенным соединениям и терапевтического ответа на них у пациентов, страдающих различными заболеваниями и нарушениями, такими как рак (например, лимфома, множественная миелома (ММ) и лейкоз, такой как острый миелолейкоз (AML)). Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболеваний с применением соединений для лечения.



ID пациента	LSC17
590	высокий
110500	nd
90191	nd
110770	высокий
110102	высокий
100348	низкий
90993	низкий
120660	низкий
100753	высокий
120706	высокий

A1

202291310

202291310

A1

**СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕЙКОЗА И ПРИМЕНЕНИЕ СИГНАТУРЫ ЛЕЙКОЗНОЙ
СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ ДЛЯ ПРОГНОЗА КЛИНИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К ТЕРАПИЯМ**

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/927052, поданной 28 октября 2019, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1. Область техники настоящего изобретения

[0001] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам применения определенных биомаркеров, таких как наборы генов (например, сигнатура лейкозной стволовой клетки (LSC)) для прогноза и контроля клинической чувствительности к определенным соединениям и терапевтического ответа на них у пациентов, страдающих различными заболеваниями и нарушениями, такими как рак (например, лимфома, множественная миелома (ММ) и лейкоз, такой как острый миелолейкоз (AML)). Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к способам лечения заболеваний с применением соединений для лечения.

2. Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0002] Рак характеризуется прежде всего увеличением числа аномальных клеток, происходящих из данной нормальной ткани, инвазией этих аномальных клеток в соседние ткани или распространением злокачественных клеток по лимфатическим путям или через кровь в регионарные лимфатические узлы и в отдаленные сайты (метастазы). В общем, рак делится на солидный рак и гематологический рак. Примеры солидного рака включают без ограничения меланому, рак надпочечников, рак молочной железы, почечноклеточный рак, рак поджелудочной железы и мелкоклеточный рак легкого (SCLC) и т.д.

[0003] Рак крови в общем включает три основных типа: лимфома, лейкоз и миелома. Лимфома относится к раку, который происходит в лимфатической системе. Лимфома включает без ограничения лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому (NHL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и периферические Т-клеточные лимфомы

(PTCL), и т.д. Лейкоз относится к злокачественным новообразованиям кроветворных тканей. При остром лейкозе преобладают недифференцированные клеточные популяции, тогда как при хроническом лейкозе участвуют более зрелые формы клеток. Острый лейкоз делится на типы острый лимфобластный лейкоз (ALL) и острый миелобластный лейкоз (AML). Хронический лейкоз делится на хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или хроническую миелоцитарную лейкемию (CML). Миелома представляет собой рак плазматических клеток костного мозга. Поскольку миелома часто возникает во многих участках костного мозга, ее часто называют множественной миеломой (MM).

[0004] Таким образом, существует огромная потребность в новых способах, лечениях и композициях, которые можно использовать для лечения пациентов, страдающих раком, включая без ограничения лимфому (например, NHL), MM, лейкоз (например, AML) и солидный рак. Был проведен ряд исследований с целью получения соединений, которые можно безопасно и эффективно использовать для лечения рака. Например, авторы настоящего изобретения недавно идентифицировали определенные соединения (например, Соединение D), полезные для лечения рака, включая без ограничения лейкоз (например, AML). Однако существует необходимость в разработке эффективных, чувствительных и точных способов обнаружения, количественного определения и определения характеристик фармакодинамической активности этих соединений. Настоящее изобретение удовлетворяет эти и другие потребности.

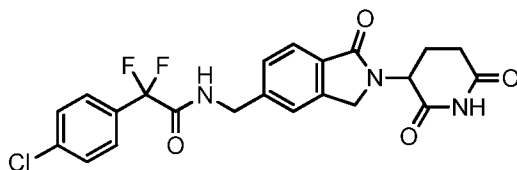
3. Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к способам идентификации субъекта, страдающего острым миелолейкозом, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение. Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, страдающего AML, соединением.

[0006] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего острым миелолейкозом (AML), который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему:

- i. взятие образца у субъекта,

ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце,
 iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и
 iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня, и соединение представляет собой 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид (Соединение D), которое имеет следующую структуру:



или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0007] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего AML, соединением, предусматривающему:

(a) идентификацию субъекта, страдающего AML, который может отвечать на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающую:

i. взятие образца у субъекта,
 ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце,
 iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и

iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня, и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение, и соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0008] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют как взвешенную сумму уровня экспрессии одного или нескольких генов.

[0009] Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой медианную оценку сигнатуры LSC в популяции.

[0010] Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой предварительно определенный уровень оценки сигнатуры LSC.

[0011] Согласно определенным вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC, которая выше ее контрольного уровня, предполагает, что субъект имеет устойчивый и/или невосприимчивый AML.

[0012] Согласно определенным вариантам осуществления один или несколько генов выбраны из группы, состоящей из

(a) CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56, AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4, GATA2, SLC25A37, SGK, LOC652694, ITPR3, LOC654103, CXCR4, FCRL3, RBM38, LILRA5, IL18RAP, CCDC109B, ISG20, MTSS1, CECR1, ADAM19, FCGR2A, AIM2, NPL, IL10RA, CTSL1, GNLY, CKAP4, ADM, KLRB1, SLC15A3, FGR, FCRLA, IL2RB, CXCL16, SLC4A1, GZMH, FLJ22662, LOC647506, GIMAP4, JAZF1, CTSH, GZMA, CHST15, AQP9, CD247, BCL6, SLC7A7, E2F2, LOC647450, GZMB, LOC652493, HBM, CD14, ALAS2, HBB, LOC642113, AHSP, FCN1, CD48, HBA2 и HBA1, или

(b) CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56, AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4 и GATA2.

[0013] Согласно определенным вариантам осуществления один или несколько генов выбраны из группы, состоящей из AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46.

[0014] Согласно определенным вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1,

DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46.

[0015] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B × масса DNMT3B) + (уровень экспрессии ZBTB46 × масса ZBTB46) + (уровень экспрессии NYNRIN × масса NYNRIN) + (уровень экспрессии ARHGAP22 × масса ARHGAP22) + (уровень экспрессии LAPTM4B × масса LAPTM4B) + (уровень экспрессии MMRN1 × масса MMRN1) + (уровень экспрессии DPYSL3 × масса DPYSL3) + (уровень экспрессии KIAA0125 × масса KIAA0125) + (уровень экспрессии CDK6 × масса CDK6) + (уровень экспрессии CPXM1 × масса CPXM1) + (уровень экспрессии SOCS2 × масса SOCS2) + (уровень экспрессии SMIM24 × масса SMIM24) + (уровень экспрессии EMP1 × масса EMP1) + (уровень экспрессии NGFRAP1 × масса NGFRAP1) + (уровень экспрессии CD34 × масса CD34) + (уровень экспрессии AKR1C3 × масса AKR1C3) + (уровень экспрессии GPR56 × масса GPR56), и масса DNMT3B находится в диапазоне от 0,08 до 0,09, масса ZBTB46 находится в диапазоне от – 0,03 до – 0,04, масса NYNRIN находится в диапазоне от – 0,008 до 0,009, масса ARHGAP22 находится в диапазоне от -0,015 до 0,01, масса LAPTM4B находится в диапазоне от -0,006 до 0,005, масса MMRN1 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса DPYSL3 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса KIAA0125 находится в диапазоне от 0,01 до 0,02, масса CDK6 находится в диапазоне от – 0,08 до – 0,07, масса CPXM1 находится в диапазоне от – 0,02 до – 0,03, масса SOCS2 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса SMIM24 находится в диапазоне от – 0,02 до – 0,03, масса EMP1 находится в диапазоне от 0,014 до 0,02, масса NGFRAP1 находится в диапазоне от 0,04 до 0,05, масса CD34 находится в диапазоне от 0,03 до 0,04, масса AKR1C3 находится в диапазоне от – 0,04 до – 0,05, и масса GPR56 находится в диапазоне от 0,04 до 0,055.

[0016] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B × 0,0874) + (уровень экспрессии ZBTB46 × – 0,0347) + (уровень экспрессии NYNRIN × 0,00865) + (уровень экспрессии ARHGAP22 × – 0,0138) + (уровень экспрессии LAPTM4B × 0,00582) + (уровень экспрессии MMRN1 × 0,0258) + (уровень экспрессии DPYSL3 × 0,0284) + (уровень экспрессии KIAA0125 × 0,0196) + (уровень экспрессии CDK6 × – 0,0704) + (уровень экспрессии CPXM1 × – 0,0258) + (уровень экспрессии SOCS2 × 0,0271) + (уровень экспрессии SMIM24 × – 0,0226) + (уровень экспрессии EMP1 × 0,0146) + (уровень экспрессии NGFRAP1 × 0,0465) + (уровень

экспрессии $CD34 \times 0,0338$) + (уровень экспрессии $AKR1C3 \times -0,0402$) + (уровень экспрессии $GPR56 \times 0,0501$).

[0017] Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень составляет 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2.

[0018] Согласно определенным вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов $TNFRSF4$, $SLC4A1$, $SLC7A7$ и $AIM2$.

[0019] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии $TNFRSF4 \times$ масса $TNFRSF4$) + (уровень экспрессии $SLC4A1 \times$ масса $SLC4A1$) + (уровень экспрессии $SLC7A7 \times$ масса $SLC7A7$) + (уровень экспрессии $AIM2 \times$ масса $AIM2$), и масса $TNFRSF4$ находится в диапазоне от $-1,5$ до -1 , масса $SLC4A1$ находится в диапазоне от 13 до 14, масса $SLC7A7$ находится в диапазоне от -4 до -3 , масса $AIM2$ находится в диапазоне от -3 до -4 .

[0020] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии $TNFRSF4 \times -1,13$) + (уровень экспрессии $SLC4A1 \times 13,59$) + (уровень экспрессии $SLC7A7 \times -3,57$) + (уровень экспрессии $AIM2 \times -3,04$).

[0021] Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень находится в диапазоне от -50 до 115, от -45 до 110, от -40 до 105, от -37 до 100, от -30 до 95, от -25 до 90, от -20 до 85, от -15 до 80, от -10 до 75, от -5 до 70, от 0 до 65, от 5 до 60, от 10 до 55, от 15 до 50, от 20 до 45, от 25 до 40 или от 30 до 35.

[0022] Согласно определенным вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов $SLC4A1$, $SLC7A7$ и $AIM2$.

[0023] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии $SLC4A1 \times$ масса $SLC4A1$) + (уровень экспрессии $SLC7A7 \times$ масса $SLC7A7$) + (уровень экспрессии $AIM2 \times$ масса $AIM2$), и масса $SLC4A1$ находится в диапазоне от 11 до 15, масса $SLC7A7$ находится в диапазоне от $-5,5$ до $-1,5$, масса $AIM2$ находится в диапазоне от -5 до -1 .

[0024] Согласно определенным вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом:

[0025] вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии $SLC4A1 \times 13,59$) + (уровень экспрессии $SLC7A7 \times -3,57$) + (уровень экспрессии $AIM2 \times -3,04$).

[0026] Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень находится в диапазоне от -65 до 110 , от -60 до 105 , от -55 до 100 , от -49 до 93 , от -45 до 90 , от -40 до 85 , от -35 до 80 , от -30 до 75 , от -25 до 70 , от -20 до 65 , от -15 до 60 , от -10 до 55 , от -5 до 50 , от 0 до 45 , от 5 до 40 , от 10 до 35 , от 15 до 30 , от 20 до 35 или от 25 до 30 .

[0027] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего AML, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. введение соединения в образец,
- iii. измерение доли одного или нескольких типов клеток,
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если доля одного или нескольких типов клеток отличается от контрольной доли клеток, и соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0028] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего AML, соединением, предусматривающему:

(a) идентификацию субъекта, страдающего AML, который может отвечать на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающую:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. введение соединения в образец,
- iii. измерение доли одного или нескольких типов клеток,
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если доля одного или нескольких типов клеток отличается от контрольной доли клеток, и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение, и соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0029] Согласно определенным вариантам осуществления контрольная доля типа клеток представляет собой долю типа клеток в образце до введения соединения.

[0030] Согласно определенным вариантам осуществления контрольная доля типа клеток представляет собой предварительно определенную долю.

[0031] Согласно определенным вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли зародышевых клеток и/или доли дифференцированных лейкозных клеток.

[0032] Согласно определенным вариантам осуществления сокращение доли зародышевых клеток и/или увеличение доли дифференцированных лейкозных клеток по сравнению с их соответствующими долями до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[0033] Согласно определенным вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли CD34+, CD15+ клеток, CD14+ клеток и/или CD11b+ клеток.

[0034] Согласно определенным вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли CD34+ клеток, и сокращение доли CD34+ клеток по сравнению с долей CD34+ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[0035] Согласно определенным вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли CD15+ клеток и/или CD14+ клеток, и увеличение доли CD15+ клеток и/или CD14+ клеток по сравнению с долей CD15+ клеток и/или CD14+ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[0036] Согласно определенным вариантам осуществления AML является невосприимчивым или устойчивым.

[0037] Согласно определенным вариантам осуществления AML устойчив к лечению с применением одного или нескольких агентов, выбранных из группы, состоящей из даунорубицина, цитарабина (ага-С) и гемтузумаб озогамицина, или устойчив к химиотерапии.

4. Краткое описание чертежей

[0038] На **фиг. 1А-1С** представлено опосредованное Соединением D разрушение GSPT1 в острых миелоидных клетках *in vitro*. На **фиг. 1А** показано разрушение GSPT1, как оценено посредством анализа проточной цитометрии с применением анти-GSPT-1

конъюгированного антитела, связывающего GSPT1, как измерено посредством MFI флуорофора Alexa flour 647, после *in vitro* инкубации Соединения D с указанным образцами пациента с AML варьирующейся оценки LSC17 в течение 4 часов. На **фиг. 1B** показано разрушение GSPT1, как оценено посредством анализа проточной цитометрии с применением анти-GSPT-1 конъюгированного антитела, связывающего GSPT1, как измерено посредством MFI флуорофора Alexa flour 647, после *in vitro* инкубации Соединения D с указанным образцами пациента с AML варьирующейся оценки LSC17 в течение 24 часов. Результаты выражены как процент от среды-контроля (1,0 эквивалентно 100%). На **фиг. 1C** показано разрушение GSPT1 после инкубации с 100 нМ Соединения D в течение 24 часов, как оценивалось для образцов пациентов с AML, получивших высокие и низкие оценки LSC17, с результатами, представленными как средние значения с планками ошибок, представляющими стандартную ошибку среднего значения. GSPT1 = Белок 1 фазового перехода G1 в S, ID = идентификация, LSC17 = 17-генная сигнатура лейкозной стволовой клетки, MFI = средняя интенсивность флуоресценции, nd = не определено.

[0039] На **фиг. 2A-2C** изображена опосредованная Соединением D индукция апоптоза бластов первичного острого миелолейкоза *in vitro*. На **фиг. 2A** показаны представлены репрезентативные точечные диаграммы проточной цитометрии для определения апоптотических клеток (верхние панели показывают апоптоз, оцененный с помощью FSC/SSC-гейтированных клеток, нижние панели показывают апоптоз, оцененный с помощью окрашивания аннексином V после обработки средой (0 нМ) или 100 нМ Соединения D). На **фиг. 2B** показан процент аннексина V+клеток (апоптотических), оцененный для 9 образцов пациентов с AML после инкубации с Соединением D (0, 3, 30 или 100 нМ). Образцы группировали по высоким и низким оценкам LSC17. На **фиг. 2C** показано общее количество клеток, оцененное для 9 образцов пациентов с AML после инкубации с Соединением D (0, 3, 30 или 100 нМ). Образцы группировали по высоким и низким оценкам LSC17. Данные приведены как среднее по группе с планками погрешностей, представляющими стандартную ошибку среднего. Значение P означает статистическое сравнение между группами LSC17 высокая и LSC17 низкая. FSC = прямое рассеяние, LSC17 = 17-генная сигнатура лейкозной стволовой клетки, SSC = боковое рассеяние, 7AAD = 7-аминоактиномицин D.

[0040] На **фиг. 3** представлено опосредованное Соединением D ингибирование колониеобразующих предшественников лейкоза. Количество колоний, образовавшихся через 24 часа, оценивали на 100000 клеток для 9 образцов пациентов с 9 после инкубации с

Соединением D (0, 3, 30 или 100 нМ) с уменьшением числа колоний в образцах, образовавших колонии, оценивали в процентах от среды-контроля, когда образцы были сгруппированы по высоким и низким оценкам LSC17. Результаты приведены как среднее по группе с планками погрешностей, представляющими стандартную ошибку среднего. ID = идентификация, LSC17 = 17-генная сигнатура лейкозной стволовой клетки.

[0041] На **фиг. 4** представлены эффекты Соединения D на ксенотрансплантаты острого миелолейкоза пациента 110500 и пациента 90191. На график нанесен процент клеток AML или клетки AML с разными маркерами (CD34+ или CD15+) из правого бедра (RF) или из костного мозга левого бедра и большеберцовой кости (BM) после лечения различными дозами Соединения D. Значения P обозначают статистическое сравнение со средой-контролем того же источника костного мозга. AML = острый миелолейкоз, Bid = два раза в день, BM = костный мозг (без инъекции), Qd = ежедневно, RF = правое бедро (AML-клетки инъецированы).

[0042] На **фиг. 5** представлена отвечаемость на Соединение D и изменения разных типов клеток в образцах с высокими оценками сигнатуры LSC17. Показан процент клеток AML или процент клеток CD34+ и абсолютное количество клеток для клеток AML или CD34+ в RF или BM из 3 образцов AML с высокими оценками LSC17. Круглые символы представляют данные по мышам, получавшим среду-контроль, а квадратные символы представляют мышей, получавших Соединение D. P-значения обозначают статистическое сравнение между лечением Соединением D и средой-контролем. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (без инъекции), LSC17 = лейкозная стволовая клетка, сигнатура 17 генов, RF = правое бедро (AML-клетки инъецированы).

[0043] На **фиг. 6** представлена отвечаемость на Соединение D и изменения разных типов клеток в образцах с низкими оценками сигнатуры LSC17. Показан процент клеток AML или процент клеток CD34+ и абсолютное количество клеток для клеток AML или CD34+ в RF или BM из 3 образцов AML с низкими оценками LSC17. Круглые символы представляют данные по мышам, получавшим среду-контроль, а квадратные символы представляют мышей, получавших Соединение D. P-значения обозначают статистическое сравнение между лечением Соединением D и средой-контролем. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (без инъекции), LSC17 = лейкозная стволовая клетка, сигнатура 17 генов, RF = правое бедро (AML-клетки инъецированы).

[0044] На **фиг. 7A-7E** изображен вторичный трансплантат после обработки Соединением D мышей с первичной трансплантацией. На **фиг. 7A** показан процент

трансплантированных клеток AML из костного мозга (RF или BM) вторичных мышей, которым инъецировали клетки образца 110590 пациента с AML, выделенные из костного мозга первичных мышей, получавших Соединение D в дозе 2,5 мг/кг. Анализ способом предельного разведения (LDA) (нижняя панель) показал 13,3 - кратное снижение количества лейкозных стволовых клеток (LSC) после введения дозы Соединение D по сравнению с средой (нижняя панель). На **фиг. 7B** показан процент трансплантированных клеток AML из костного мозга (RF или BM) вторичных мышей, которым инъецировали клетки образца 120860 пациента с AML, выделенные из костного мозга первичных мышей, получавших Соединение D в дозе 2,5 мг/кг. Анализ способом предельного разведения (LDA) (нижняя панель) не показал различий в частоте LSC. На **фиг. 7C** показан процент трансплантированных клеток AML из костного мозга (RF) вторичных мышей, которым инъецировали клетки образца 100348 пациента с AML, выделенные из костного мозга первичных мышей, которым вводили Соединение D в дозе 2,5 мг/кг. На **фиг. 7D** показан процент клеток CD45+ в выделенном костном мозге мышей, получавших первичное лечение, для каждого образца пациента. Также показано общее количество клеток и общее количество клеток AML, инъецированных каждой вторичной мышью (без истощения клеток мыши). На **фиг. 7E** показан процент трансплантата AML у вторичных мышей, получавших клетки образца 110102 пациента с AML (вверху) или образца 0590 пациента с AML (внизу), от первичных ксенотрансплантированных мышей, получавших среду или Соединение D, где каждый символ представляет одну вторичную трансплантированную мышь. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (без инъекции), ID = идентификация, К = тысяча, М = миллион, RF = правое бедро (клетки AML инъецированы).

[0045] На **фиг. 8A-8B** представлен репрезентативный анализ проточной цитометрии ксенотрансплантата пуповинной крови. На **фиг. 8A** показана репрезентативная стратегия гейтирования для идентификации клеточных популяций, выделенных из ксенотрансплантированной пуповинной кровью среды. На **фиг. 8B** показана репрезентативная стратегия гейтирования для идентификации клеточных популяций, выделенных из костного мозга мышей, получавших Соединение D. Клетки CD45+ гейтировали (GlyA-CD45+, левый столбец) и далее субгейтировали для определения экспрессии CD38 и CD34 (второй столбец слева) или экспрессии CD19 и CD33 (средний столбец). Клетки GlyA-CD45+ и GlyA-CD45+CD33+ были субгейтированы для определения экспрессии CD14 и CD15 (второй справа

и крайний правый столбцы соответственно). BM = костный мозг (без инъекции), GlyA = гликофорин A, RF = правое бедро (инъецированные клетки острого миелолейкоза).

[0046] На **фиг. 9A-9D** показаны эффекты Соединения D на популяции трансплантатов пуповинной крови. Проценты или абсолютное количество клеток каждого из типов субклеток наносили на график для трансплантированных клеток CB1 и CB2. На **фиг. 9A** показан процент или абсолютное число трансплантированных клеток CB1 и CB2. На **фиг. 9B** показан процент или абсолютное число CD19⁺ клеток или CD33⁺ клеток. На **фиг. 9C** показан процент или абсолютное число CD15⁺ клеток или CD14⁺ клеток в CD45⁺ трансплантате. На **фиг. 9D** показан процент или абсолютное число клеток GlyA⁺ клеток. Круглые символы представляют данные для мышей, получавших среду-контроль, а квадратные символы представляют данные для мышей, получавших Соединение D. Значения P обозначают статистическое сравнение лечения Соединением D, по сравнению с контролем. BM = костный мозг (без инъекции), CB = пуповинная кровь, GlyA = гликофорин A, RF = правое бедро (с инъекцией клеток AML).

[0047] На **фиг. 10A-10D** показаны эффекты Соединения D на CD34⁺ и CD34⁺/CD38⁻ примитивные клетки. Проценты или абсолютное количество клеток для каждого из типов субклеток наносили на график для RF или BM для трансплантированных клеток CB1 и CB2. На **фиг. 10A** показан процент или абсолютное число CD34⁺ клеток. На **фиг. 10B** показан процент или абсолютное число CD34⁺/CD38⁻ клеток. На **фиг. 10C** показан процент или абсолютное число CD34⁺/CD19⁺ клеток. На **фиг. 10D** показан процент или абсолютное число CD34⁺/CD33⁺ клеток. Круглые символы представляют данные для мышей, получавших среду-контроль, а квадратные символы представляют данные для мышей, получавших Соединение D. Значения P обозначают статистическое сравнение лечения Соединением D, по сравнению с контролем. BM = костный мозг (без инъекции), CB = пуповинная кровь, RF = правое бедро (с инъекцией клеток AML).

[0048] На **фиг. 11** представлены эффекты Соединения D на трансплантат острого миелолейкоза у мышей NOD/SCID. Человеческие CD45⁺/CD33⁺ трансплантата AML в инъецированной бедренной кости (RF, верхняя панель) и неинъецированных костях (BM, нижняя панель) мышей, получавших Соединения D (квадрат) или среду-контроль (круг), были суммированы. Каждый символ указывает уровень приживления у каждой обработанной мыши, а столбцы указывают средние значения для каждой обработанной группы. AML = острый

миелолейкоз, BM = костный мозг (кости без инъекции), ns = незначительно, RF = правое бедро (кость с инъекцией). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0049] На **фиг. 12А-12Е** показаны фенотипические профили, индуцированные введением Соединения D. На **фиг. 12А** показан репрезентативный анализ проточной цитометрии маркеров клеточной поверхности CD15, CD14, CD34 и CD38 в лейкозных клетках трансплантата AML после обработки соединением D или средой. На **фиг. 12В** показан репрезентативный анализ проточной цитометрии маркеров клеточной поверхности CD15, CD14, CD34, CD11b и CD38 в лейкозных клетках трансплантата AML после обработки соединением D или средой. На **фиг. 12С** показан процент клеток CD34+ из трансплантата AML после обработки соединением D (квадраты) или средой-контролем (кружки). На **фиг. 12D** показан процент клеток CD15+ из трансплантата AML после обработки соединением D (квадраты) или средой-контролем (кружки). На **фиг. 12Е** показан процент клеток CD14+ из трансплантата AML после обработки соединением D (квадраты) или средой-контролем (кружки). Образцы были сгруппированы в 3 категории: увеличение (верхняя панель), уменьшение (средняя панель) и отсутствие изменений (нижняя панель) клеток CD34+, CD15+ и CD14+. Каждый символ указывает процент соответствующей популяции в трансплантате AML каждой обработанной мыши. Процент в скобках после каждого номера пациента представляет собой относительное снижение при лечении Соединением D, чтобы указать реакцию каждого образца на лекарственное средство. Столбцы указывают средние значения. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (кости без инъекции), ns = незначительно, RF = правое бедро (кости с инфекцией). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0050] На **фиг. 13** представлены гетерогенные ответы на Соединение D в трансплантате первичного острого миелолейкоза и корреляция с оценками LSC17. Влияние Соединения D на трансплантат острого миелолейкоза (AML) было представлено в виде процента снижения AML по сравнению с обработкой средой-носителем. Каждый символ представляет относительное снижение медианы приживления AML для каждого образца пациента, а длинные горизонтальные полосы указывают средние значения для каждой группы, а более короткие горизонтальные полосы указывают на стандартную ошибку среднего (SEM). Образцы были суммированы в целом (закрашенный кружок) и сгруппированы в группы с высокими оценками LSC17 (квадраты) и низкими оценками LSC17 (треугольники). BM = костный мозг (кости без инъекции), LSC = лейкозная стволовая клетка, RF = правое бедро (кости с инфекцией).

[0051] На **фиг. 14A-14C** показаны генная сигнатура LSC4 и генная сигнатура LSC3 и их прогноз ответа на лечение Соединением D. Профили экспрессии генов были созданы с помощью RNA-Seq из первичных клеток каждого образца пациента. На **фиг. 14A** представлена оценка из 4 генов (LSC4), идентифицированная из 89 связанных с LSC наборов генов. Сплошная кривая представляет собой % снижения лекарственным средством в экспериментах, а пунктирная кривая представляет % снижения, предсказанный на основе оценок из 4 генов. На **фиг. 14B** показана дискретизация прогнозов по среднему порогу либо «ответ», либо «отсутствие ответа» и связь между оценками и % снижения ($r = 0,87$, $p = 0,02$). Сплошная кривая представляет % снижения лекарственным средством в экспериментах, а пунктирная кривая представляет прогноз % снижения по оценке из 4 генов. На **фиг. 14C** показана оценка из 3 генов (LSC3), идентифицированная среди приблизительно 46 LSC - набора генов, которая может прогнозировать ответ на Соединение D с очень похожими результатами на генную сигнатуру LSC4, описанную выше. Сплошная кривая представляет % снижения лекарственным средством в экспериментах, а пунктирная кривая представляет прогноз % снижения по оценкам из 3 генов.

[0052] На **фиг. 15A-15D** приведены клинические характеристики пациентов и ответ трансплантатов на Соединение D. На **фиг. 15A** представлено, что образцы были охарактеризованы по их ответам на Соединение D на основе их профилей *de novo* по сравнению с вторичными/рецидивом. На **фиг. 15B** представлено, что образцы были охарактеризованы по их ответам на Соединение D на основе их профилей неблагоприятного и промежуточного прогноза. На **фиг. 15C** представлено, показано, что образцы были охарактеризованы по их ответам на Соединение D на основе их профилей цитогенетически нормального и аномального кариотипов. На **фиг. 15D** представлено, что образцы были охарактеризованы по их ответам на Соединение D на основе их профилей Flt3-ITD по сравнению с Flt3 дикого типа при цитогенетически нормальном AML. Каждый символ представляет относительное снижение медианы приживления AML для каждого образца пациента, а столбцы указывают медианные значения. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (кости без инъекции), CN-AML = цитогенетически нормальный острый миелолейкоз, Flt3 -ITD = тирозинкиназа *fmslike 3* с внутренней tandemной дупликацией, RF = правое бедро (кости с инъекцией).

[0053] На **фиг. 16A-16D** показано, что Соединение D индуцирует *in vitro* апоптоз острого миелолейкоза посредством снижения GSPT1. Клетки острого миелолейкоза

культивировали *in vitro* в среде с добавлением факторов роста при различных концентрациях Соединения D. На **фиг. 16А** показано разрушение GSPT1 в первичных лейкозных клетках при 24 часах воздействия Соединения D. На **фиг. 16В** показана индукция апоптоза в лейкозных клетках. На **фиг. 16С** показано уменьшение количества живых клеток при лечении Соединением D. На **фиг. 16D** показано уменьшение количества колониеобразующих лейкозных клеток-предшественников под действием Соединения D. GSPT1 = Белок 1 фазового перехода G1 в S.

[0054] На **фиг. 17** представлена индукция апоптоза и гибель клеток при обработке Соединением D. Апоптоз и гибель клеток у мышей, получавших Соединение D, оценивали путем окрашивания клеток йодидом пропидия. Каждый символ указывает процент событий PI+ у отдельных мышей, получавших среду (круг) или Соединение D (квадрат). Столбцы указывают средние значения. BM = костный мозг (кости без инъекции), PI = йодид пропидия, RF = правое бедро (кости с инъекцией). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0055] На **фиг. 18А-18В** показано, что лечение соединением D разрушает GSPT1 в трансплантате острого миелолейкоза. Внутриклеточную проточную цитометрию (FACS) проводили для измерения экспрессии GSPT1 после введения 3 доз Соединения D мышам с AML. На **фиг. 18А** показана средняя интенсивность флуоресценции GSPT1 в клетках AML CD33+, полученных из инъецированных RF (верхняя панель) и неинъецированных BM (нижняя панель) мышей, получавших среду (круг) и Соединение D (квадрат). Каждый символ указывает данные от отдельной мыши, получавшей среду (круг) или Соединение D (квадрат), а столбцы указывают средние значения. Цифры над точками данных представляют собой значения p между лечением Соединением D и контролями. На **фиг. 18В** показано относительное снижение GSPT1 под действием Соединения D. Каждая полоса указывает процент медианы MFI GSPT1 при лечении Соединением D по сравнению со средой-контролем. Процент в скобках после каждого номера пациента представляет собой относительное снижение за 4 недели лечения Соединением D, чтобы указать ответ каждого образца на лекарственное средство. AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (кости с инъекцией), GSPT1 = белок 1 фазового перехода G1 в S, MFI = средняя интенсивность флуоресценции, PI = йодид пропидия, RF правая бедренная кость (кости без инъекции).

[0056] На **фиг. 19** представлен репрезентативный анализ предельного разведения вторичной трансплантации (график доверительного интервала частот лейкозной стволовой

клетки). Сплошные линии указывают среднюю оценку частоты LSC, а пунктирные линии указывают нижний и верхний диапазон оценки частоты LSC у первичных мышей, получавших срежу-контроль (серые точки) или Соединение D (черные точки). Каждый отдельный символ показывает логарифмическую долю не отвечающих на каждую дозу клеток. LSC = лейкозная стволовая клетка, Veh = среда.

5. Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0057] Определенные соединения, раскрытые в настоящем документе, включая Соединение D, являются модуляторами лигазы цереблona E3. Например, Соединение D вызывает деградацию белка 1 фазового перехода G1 в S фактора терминации трансляции (GSPT1) и приводит к интегрированному ответу на стресс, активации реакции несвернутых белков (UPR) и апоптозу в клетках острого миелолейкоза (AML). Соединение D находится на стадии клинической разработки для лечения рецидивирующего и невосприимчивого AML.

[0058] Невосприимчивость к индукционной химиотерапии и рецидив после достижения ремиссии являются основными препятствиями для излечения AML. После стандартной индукционной химиотерапии пациентам назначают различные постремиссионные стратегии на основе цитогенетических и молекулярных аномалий, которые широко определяют неблагоприятные, промежуточные и благоприятные категории риска. Тем не менее, некоторые пациенты не отвечают на индукционную терапию, а у других пациентов в конечном итоге возникает рецидив, несмотря на отсутствие неблагоприятных факторов риска. Существует острая необходимость в улучшенных биомаркерах для выявления этих пациентов с высоким риском и лечения этой группы пациентов.

[0059] Для разработки прогнозирующих и/или прогностических биомаркеров, связанных со стволовостью, Ng *et al.* (Ng SW *et al. Nature.* 2016,540(7633): 433-37) создали оценку 17 генов с использованием популяций функциональных стволовых клеток лейкоза (оценка LSC17). Более подробная информация о способе создания оценки LSC17 описана в разделе 6.1 Как показано Ng *et al.*, пациенты с высокими оценками LSC17 имели плохие результаты при существующем в настоящее время лечении, включая аллогенную трансплантацию стволовых клеток.

[0060] В ходе исследований, проведенных авторами настоящего изобретения, описанных в разделе 6.2, неожиданным образом образцы AML с высокими оценками LSC17 оказались более чувствительными к лечению Соединением D по сравнению с образцами с

низкими оценками LSC17. Кроме того, в исследованиях, описанных в разделе 6.3, большинство образцов с высокими оценками LSC17 хорошо отвечали на Соединение D, и более чем в половине из них AML был устранен в костном мозге мышей.

[0061] Неожиданные наблюдения, раскрытые в настоящем документе, показывают, что Соединение D можно использовать для лечения пациентов, страдающих AML, заболевания которых более агрессивны в контексте первичной индукционной терапии, и/или пациентов с невосприимчивым AML, устойчивым к обычным способам лечения, таким как химиотерапия.

[0062] Кроме того, как показано в разделе 6, настоящее изобретение также идентифицирует маркеры клеточной поверхности или их изменения, полезные для прогноза ответа на соединение для лечения (например, Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, таутомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват, изотополог, пролекарство, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф).

5.1. Определения

[0063] В контексте настоящего изобретения термин «рак» включает без ограничения солидный рак и гематологический рак. Термин «рак» относится к заболеванию тканей или органов, включая без ограничения рак мочевого пузыря, костей, крови, головного мозга, молочной железы, шейки матки, грудной клетки, толстой кишки, эндометрия, пищевода, глаз, головы, почек, печени, лимфатических узлов, легких, рта, шеи, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, прямой кишки, кожи, желудка, яичек, горла и матки. Конкретные виды рака включают без ограничения запущенную злокачественную опухоль, амилоидоз, нейробластому, менингиому, гемангиоперицитому, множественные метастазы головного мозга, мультиформную глиобластому, глиобластому, глиому ствола головного мозга, злокачественную опухоль головного мозга с плохим прогнозом, злокачественную глиому, рецидивирующую злокачественную глиому, анапластическую астроцитому, анапластическую олигодендроглиому, нейроэндокринную опухоль, аденокарциному прямой кишки, неоперабельную колоректальную карциному, метастатическую гепатоцеллюлярную карциному, саркому Капоши, каротип острого миелобластного лейкоза, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, кожную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому низкой степени злокачественности, злокачественную меланому, злокачественную мезотелиому,

синдром мезотелиомы злокачественного плеврального выпота, брюшинную карциному, папиллярную серозную карциному, гинекологическую саркому, саркому мягких тканей, склеродермию, кожный васкулит, лангергансоподобный гистиоцитоз, лейомиосаркому, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, гормонорезистентный рак предстательной железы, резецированную саркому мягких тканей высокого риска, нерезектабельную гепатоцеллюлярную карциному, макроглобулинемию Вальденстрема, вялотекущую миелому, невыраженную миелому, рак фаллопиевых труб, андрогеннезависимый рак предстательной железы, андрогензависимый неметастатический рак предстательной железы IV стадии, нечувствительный к гормональной терапии рак предстательной железы, нечувствительный к химиотерапии рак предстательной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, фолликулярную карциному щитовидной железы, медуллярную карциному щитовидной железы и лейомиому.

[0064] В контексте настоящего изобретения термин «гематологическая злокачественная опухоль» включает миелому, лимфому и лейкоз. Согласно одному варианту осуществления миеломой является множественная миелома. Согласно некоторым вариантам осуществления лейкоз представляет собой, например, острый миелогенный лейкоз (AML), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), Т-клеточный лейкоз взрослых, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточный лейкоз, миелодисплазию, миелопролиферативные нарушения, хронический миелогенный лейкоз (CML), миелодиспластический синдром (MDS), лейкоз типа лимфотропного вируса 1 человека (HTLV-1), мастоцитоз или В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. Согласно некоторым вариантам осуществления лимфомой является, например, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), В-клеточная иммунобластная лимфома, мелкоклеточная лимфома с нерассеченными ядрами, лейкоз/лимфома типа лимфотропного вируса 1 человека 1 (HTLV-1), Т-клеточная лимфома взрослых, периферическая Т-клеточная лимфома (PTCL), кожная Т-клеточная лимфома (CTCL), мантийноклеточная лимфома (MCL), лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), СПИД-ассоциированная лимфома, фолликулярная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, крупноклеточная В-клеточная лимфома, обогащенная Т-клетками/гистиоцитами, трансформированная лимфома, первичная медиастинальная (тимусная) крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны селезенки, трансформация Рихтера, узловая лимфома маргинальной зоны или ALK-положительная крупноклеточная В-клеточная лимфома. Согласно одному варианту

осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой невыраженную лимфому, включая, например, DLBCL, фолликулярную лимфому или лимфому маргинальной зоны.

[0065] Термин «прогностический риск», при использовании в связи с раком, относится к возможным исходам рака, включая ответ на определенные виды лечения, продолжительность или степень ремиссии, потенциальную выживаемость, вероятность рецидива и т.д. Факторы, влияющие на прогностический риск пациента, включают без ограничения демографический (например, возраст, раса, пол и т.д.), специфический для заболевания (например, стадия рака), генетический (например, ген риска), сопутствующие заболевания (например, другие состояния, сопутствующие раку) и т.д. Хороший «прогностический риск» означает, что пациент, вероятно, будет отвечать на определенное лечение, с большой вероятностью выживет и/или маловероятен рецидив и т.д. Плохой «прогностический риск» означает, что маловероятно, что пациент будет отвечать на определенные виды лечения, маловероятно выживет и/или может возникнуть рецидив и т.д.

[0066] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к действию, которое происходит, когда пациент страдает определенным видом рака, которое уменьшает тяжесть рака или останавливает или замедляет его прогрессирование.

[0067] Термин «чувствительность» или «чувствительный» применительно к лечению соединением является относительным термином, который относится к степени эффективности соединения при уменьшении или замедлении прогрессирования опухоли или заболевания, подлежащего лечению. Например, термин «повышенная чувствительность», при использовании в отношении обработки клетки или опухоли соединением, относится к увеличению на по меньшей мере приблизительно 5% или более эффективности лечения опухоли.

[0068] В контексте настоящего изобретения термины «соединение» и «соединение для лечения» используются взаимозаменяемо и включают неограничивающие примеры соединений, раскрытые в разделе 5.5 ниже.

[0069] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «терапевтически эффективное количество» соединения представляет собой количество, достаточное для обеспечения терапевтического эффекта при лечении или контроле рака, или для задержки или сведения к минимуму одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

Терапевтически эффективное количество соединения означает количество терапевтического средства, отдельно или в комбинации с другими видами терапии, которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении или контроле рака. Термин «терапевтически эффективное количество» может охватывать количество, которое улучшает общую терапию, уменьшает или устраняет симптомы или причины рака или усиливает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства. Этот термин также относится к количеству соединения, достаточному для того, чтобы вызвать биологический или медицинский ответ биологической молекулы (например, белка, фермента, РНК или ДНК), клетки, ткани, системы, животного или человека, на который нацелен исследователь, ветеринар, врач или клиницист.

[0070] Термин «отвечаемость» или «ответ» при использовании в отношении лечения относится к степени эффективности лечения при уменьшении или сокращении симптомов заболевания, например, рака, такого как ММ или AML, подлежащего лечению. Например, термин «повышенная отвечаемость», при использовании в отношении лечения клетки или субъекта, относится к увеличению эффективности уменьшения или ослабления симптомов заболевания по сравнению с эталонным лечением (например, той же клетки или субъекта, или другой клетки или субъекта) при измерении с использованием любых способов, известных в данной области техники. Согласно определенным вариантам осуществления увеличение эффективности составляет по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40% или по меньшей мере приблизительно 50%.

[0071] Улучшение состояния рака или связанного с раком заболевания можно охарактеризовать как полный или частичный ответ. «Полный ответ» относится к отсутствию клинически выявляемого заболевания с нормализацией любых ранее аномальных рентгенологических исследований, костного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) или аномальных измерений моноклонального белка. «Частичный ответ» означает уменьшение всей измеренной опухолевой массы на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или приблизительно 90% (*т.е.*, количества злокачественных клеток, присутствующих у субъекта, или измеренной опухолевой массы, или количества аномального моноклонального белка) при отсутствии новых поражений. Термин «лечение» охватывает как полный, так и частичный ответ.

[0072] Термин «вероятно» в общем относится к увеличению вероятности события. Термин «вероятно», при использовании в отношении эффективности ответа опухоли пациента, в общем подразумевает повышенную вероятность того, что скорость роста опухоли или роста опухолевых клеток уменьшится. Термин «вероятно» при использовании в отношении эффективности ответа опухоли у пациента может также в целом означать увеличение показателей, таких как экспрессия мРНК или белка, которые могут свидетельствовать об увеличении прогресса в лечении опухоли.

[0073] Термин «прогноз» в общем означает определение или указание заранее. При использовании для «прогноза» эффективности лечения рака, например, термин «прогноз» может означать, что вероятность исхода лечения рака может быть определена в самом начале, до начала лечения или до того, как период лечения существенно продвинулся.

[0074] В контексте настоящего изобретения термин «контроль» в общем относится к наблюдению, контролю, регулированию, присмотру, отслеживанию или надзору за активностью. Например, термин «контроль эффективности соединения» относится к отслеживанию эффективности лечения рака у пациента или в культуре опухолевых клеток. Таким же образом, термин «контроль», при использовании в связи с соблюдением пациентом режима лечения либо индивидуально, либо в рамках клинического исследования, относится к отслеживанию или подтверждению того, что пациент действительно принимает лекарственное средство, которое тестируют в соответствии с предписаниями. Контроль можно проводить, например, путем отслеживания экспрессии мРНК или белковых биомаркеров.

[0075] В контексте настоящего изобретения термин «регулировать» относится к контролю активности молекулы или биологической функции, например, усилению или уменьшению активности или функции.

[0076] Термин «невосприимчивый» или «устойчивый» относится к обстоятельствам, когда у пациентов даже после интенсивного лечения остаются остаточные раковые клетки (например, клетки лейкоза или лимфомы) в их лимфатической системе, крови и/или кроветворных тканях (например, в костном мозге).

[0077] «Биологический маркер» или «биомаркер» представляет собой вещество, обнаружение которого указывает на определенное биологическое состояние, такое как, например, наличие рака. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры можно определять индивидуально. Согласно другим вариантам осуществления несколько биомаркеров могут быть измерены одновременно. Согласно некоторым вариантам

осуществления «биомаркер» указывает на изменение уровня экспрессии мРНК, которое может коррелировать с риском или прогрессированием заболевания, или с восприимчивостью заболевания к данному лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как мРНК или кДНК. Согласно дополнительным вариантам осуществления «биомаркер» указывает на изменение уровня экспрессии полипептида или белка, которое может коррелировать с риском или прогрессированием заболевания или восприимчивостью пациента к лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер может представлять собой полипептид или белок или их фрагмент. Относительный уровень конкретных белков можно определить способами, известными в данной области техники. Например, можно использовать способы на основе антител, такие как иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или другие способы.

[0078] В контексте настоящего изобретения термин «набор генов» относится к одному или нескольким генам, выбранным специалистом в данной области техники. Гены могут быть сгруппированы на основе их взаимосвязи друг с другом, их связи с определенными типами клеток, биологическими функциями, фенотипами или клеточными путями и т.д. или исключительно на усмотрение специалиста в данной области техники. Набор генов, используемый в контексте настоящего изобретения, может включать только один ген или сотни, тысячи или сотни тысяч генов.

[0079] В контексте настоящего изобретения «сигнатура» или «генная сигнатура» относится к группе генов. Согласно некоторым вариантам осуществления группы генов связаны друг с другом благодаря их ассоциации с определенными типами клеток, биологическими функциями, фенотипами или клеточными путями и т.д. Сигнатура может быть определена специалистом в данной области техники на основе различных экспериментальных данных и/или способов статистического анализа, т.е. конкретная сигнатура может содержать разное количество генов или разные конкретные гены в зависимости от критериев, которые выбирает специалист в данной области техники. Примером генной сигнатуры является сигнатура LSC.

[0080] В контексте настоящего изобретения «LSC17» или «сигнатура LSC17» относится к генной сигнатуре, содержащей следующие 17 генов: AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. В контексте настоящего изобретения «LSC4» или

«сигнатура LSC4» относится к генной сигнатуре, содержащей следующие 4 гена: TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. В контексте настоящего изобретения «LSC3» или «сигнатура LSC3» относится к генной сигнатуре, содержащей следующие 3 гена: SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. В контексте настоящего изобретения «оценка LSC17» или «оценка сигнатуры LSC17» относится к оценке, вычисленной на основе уровня экспрессии сигнатуры LSC17, которая содержит следующие 17 генов: AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. Подобным образом, в контексте настоящего изобретения «оценка LSC4 » или «оценка сигнатуры LSC4» представляет собой оценку, вычисленную на основе уровня экспрессии сигнатуры LSC4, описанной выше. В контексте настоящего изобретения «оценка LSC3» или «оценка сигнатуры LSC3» представляет собой оценку, вычисленную на основе уровня экспрессии сигнатуры LSC3, описанной выше.

[0081] Термины «полипептид» и «белок», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимеру из трех или более аминокислот в последовательном ряду, соединенных пептидными связями. Термин «полипептид» включает белки, фрагменты белков, аналоги белков, олигопептиды и т.п. В контексте настоящего изобретения термин «полипептид» также может относиться к пептиду. Аминокислоты, составляющие полипептид, могут быть природного происхождения или могут быть синтетическими. Полипептид может быть очищен из биологического образца. Полипептид, белок или пептид также включают модифицированные полипептиды, белки и пептиды, например, гликополипептиды, гликобелки или гликопептиды, или липополипептиды, липобелки или липопептиды.

[0082] В контексте настоящего изобретения термин «экспрессированный» или «экспрессия» относится к транскрипции гена с получением молекулы нуклеиновой кислоты РНК, по меньшей мере частично комплементарной области одной из двух цепей нуклеиновой кислоты гена. В контексте настоящего изобретения термин «экспрессированный» или «экспрессия» также относится к трансляции молекулы РНК с получением белка, полипептида или их части.

[0083] Термин «уровень экспрессии» относится к количеству, накоплению или скорости синтеза молекулы биомаркера или набора генов. Уровень экспрессии может быть представлен, например, количеством или скоростью синтеза матричной РНК (мРНК), кодируемой геном, количеством или скоростью синтеза полипептида или белка, кодируемого геном, или количеством или скоростью синтез биологической молекулы, накапливаемой в

клетке или биологической жидкости. Термин «уровень экспрессии» относится к абсолютному количеству молекулы в образце или относительному количеству молекулы, определенному в стационарных или нестационарных условиях.

[0084] Уровень мРНК, уровень экспрессии которой «повышающе регулируется», обычно повышается при данном лечении или состоянии или у определенных групп пациентов. Пониженная регуляция мРНК обычно относится к снижению уровня экспрессии мРНК в ответ на данное лечение или состояние или у определенных групп пациентов. В некоторых ситуациях уровень мРНК может оставаться неизменным при данном лечении или состоянии. мРНК образца пациента может «повышающе регулироваться» при лечении лекарственным средством по сравнению с необработанным контролем. Эта повышающая регуляция может представлять собой, например, увеличение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 500%, приблизительно 1000%, приблизительно 5000% или более относительно сопоставимого контрольного уровня мРНК. Альтернативно, мРНК может «понижающе регулироваться» или экспрессироваться при более низком уровне в ответ на введение определенных соединений или других агентов. мРНК с понижающей регуляцией, например, присутствует при уровне приблизительно 99%, приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 80%, приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20%, приблизительно 10%, приблизительно 1% или менее относительно сопоставимого контрольного уровня мРНК.

[0085] Подобным образом, уровень биомаркера полипептида или белка в образце пациента может быть повышен при лечении лекарственным средством по сравнению с необработанным контролем. Это увеличение может составлять приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 500%, приблизительно 1000%, приблизительно 5000% или более относительно сопоставимого контрольного уровня белка. Альтернативно, уровень белкового биомаркера может снижаться в ответ на введение определенных соединений или других агентов. Это уменьшение может составлять, например, присутствие при уровне

приблизительно 99%, приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 80%, приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20%, приблизительно 10%, приблизительно 1% или менее относительно сопоставимого контрольного уровня белка.

[0086] В контексте настоящего изобретения термины «определение», «измерение», «оценка», «анализ» и «тестирование» обычно относятся к любой форме измерения и включают определение того, присутствует ли элемент или нет. Эти термины включают количественные и/или качественные определения. Оценка может быть относительной или абсолютной. «Оценка присутствия» может включать определение количества чего-либо присутствующего, а также определение того, присутствует ли оно или отсутствует.

[0087] Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для описания полимера любой длины, состоящего из нуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, или соединений, полученных синтетическим путем, которые могут гибридизоваться со встречающимися в природе нуклеиновыми кислотами в специфической последовательности, аналогичным образом двум встречающимся в природе нуклеиновым кислотам, например, могут участвовать во взаимодействиях спаривания оснований Уотсона-Крика. Используемый в настоящем документе в контексте полинуклеотидной последовательности термин «основания» (или «основание») является синонимом «нуклеотидов» (или «нуклеотида»), т.е. мономерной субъединицы полинуклеотида. Предполагается, что термины «нуклеозид» и «нуклеотид» включают те фрагменты, которые содержат не только известные пуриновые и пиримидиновые основания, но и другие модифицированные гетероциклические основания. Такие модификации включают метилированные пурины или пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины, алкилированные рибозы или другие гетероциклы. Кроме того, термины «нуклеозид» и «нуклеотид» включают те фрагменты, которые содержат не только обычные сахара рибозы и дезоксирибозы, но также и другие сахара. Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды также включают модификации сахарного фрагмента, например, где одна или несколько гидроксильных групп заменены атомами галогена или алифатическими группами или функционализированы в виде простых эфиров, аминов и т.п. «Аналоги» относятся к молекулам со структурными признаками, признанными в литературе миметиками, производными, имеющими аналогичную структуру или другими подобными терминами, и

включают, например, полинуклеотиды, включающие неприродные нуклеотиды, миметики нуклеотидов, такие как 2'-модифицированные нуклеозиды, пептидные нуклеиновые кислоты, олигомерные нуклеозидфосфонаты и любые полинуклеотиды с добавленными замещающими группами, такими как защитные группы или связывающие фрагменты.

[0088] Термин «комплементарный» относится к специфическому связыванию между полинуклеотидами на основе последовательностей полинуклеотидов. В контексте настоящего изобретения первый полинуклеотид и второй полинуклеотид являются комплементарными, если они связываются друг с другом в анализе гибридизации в строгих условиях, например, если они производят данный или определяемый уровень сигнала в анализе гибридизации. Части полинуклеотидов комплементарны друг другу, если они следуют общепринятым правилам спаривания оснований, например, пары А с Т (или U) и пары G с C, хотя небольшие области (например, менее приблизительно 3 оснований) несоответствия, вставки или делеции последовательности могут присутствовать.

[0089] Термины «выделенное» и «очищенное» относятся к выделению вещества (такого как мРНК, ДНК или белок) таким образом, что это вещество составляет значительную долю образца, в котором оно находится, т.е. больше, чем доля вещества, которая обычно обнаруживается в его естественном или невыделенном состоянии. Как правило, значительная доля образца составляет, например, более 1 %, более 2 %, более 5 %, более 10 %, более 20 %, более 50 % или более, обычно до приблизительно 90 %-100% образца. Например, образец выделенной мРНК обычно может содержать по меньшей мере приблизительно 1% всей мРНК. Способы очистки полинуклеотидов хорошо известны в данной области техники и включают, например, гель-электрофорез, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, проточную сортировку и седиментацию по плотности.

[0090] В контексте настоящего изобретения термин «связанный» указывает на прямое или не прямое присоединение. В контексте химических структур «связанный» (или «соединенный») может относиться к существованию химической связи, непосредственно соединяющей две части или опосредованно соединяющей две части (например, через связывающую группу или любую другую промежуточную часть молекулы). Химическая связь может быть ковалентной связью, ионной связью, координационным комплексом, водородной связью, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями или гидрофобной укладкой, или может проявлять характеристики нескольких типов химических связей. В некоторых случаях

«связанный» включает варианты осуществления, в которых присоединение является прямым, и варианты осуществления, в которых присоединение является непрямым.

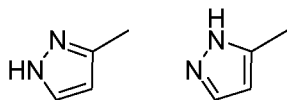
[0091] В контексте настоящего изобретения термин «образец» относится к веществу или смеси веществ, обычно, хотя и не обязательно, в жидкой форме, содержащих один или несколько представляющих интерес компонентов.

[0092] В контексте настоящего изобретения термин «биологический образец» относится к образцу, полученному у биологического субъекта, включая образец биологической ткани или жидкости, взятый, полученный или собранный *in vivo* или *in situ*. Биологический образец также включает образцы из области биологического субъекта, содержащей предраковые или раковые клетки или ткани. Такими образцами могут быть без ограничения ткани и клетки, выделенные у млекопитающего. Примеры биологических образцов включают без ограничения клеточный лизат, клетки, ткани, органы, органеллы, биологическую жидкость, образец крови, образец мочи, образец кожи и т.п. Предпочтительные биологические образцы включают без ограничения цельную кровь, частично очищенную кровь, РВМС, биопсии тканей (включая биопсии опухолей), циркулирующие опухолевые клетки и т.п.

[0093] В контексте настоящего изобретения термин «полимеразная цепная реакция» или «ПЦР» обычно относится к процедуре, при которой небольшие количества нуклеиновой кислоты, РНК и/или ДНК амплифицируют, как описано, например, в патенте США № 4683195. Как правило, должна быть доступна информация о последовательности от концов представляющей интерес области или за ее пределами, чтобы можно было сконструировать олигонуклеотидные праймеры, эти праймеры будут идентичны или подобны по последовательности с противоположными нитями матрицы, подлежащей амплификации. 5'-концевые нуклеотиды двух праймеров могут совпадать с концами амплифицируемого вещества. ПЦР можно использовать для амплификации специфических последовательностей РНК, специфических последовательностей ДНК из общей геномной ДНК и кДНК, транскрибированной из общей клеточной РНК, последовательностей бактериофагов или плазмид и т.д. См. в общем Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1987, 51:263-273, PCR Technology (Stockton Press, NY, Erlich, ed., 1989).

[0094] В контексте настоящего изобретения термин «таутомер» относится к изомерным формам соединения, которые находятся в равновесии друг с другом. Концентрации изомерных форм будут зависеть от среды, в которой находится соединение, и могут быть

различными в зависимости, например, от того, является ли соединение твердым или находится в органическом или водном растворе. Например, в водном растворе пиразолы могут иметь следующие изомерные формы, которые упоминаются как таутомеры друг друга:



[0095] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «фармацевтически приемлемая соль» включает нетоксичные соли присоединения кислоты и основания соединения, к которому относится этот термин. Приемлемые нетоксичные соли присоединения кислоты включают соли, полученные из органических и неорганических кислот, известных в данной области техники, которые включают, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту, метансульфоновую кислоту, уксусную кислоту, винную кислоту, молочную кислоту, янтарную кислоту, лимонную кислоту, яблочную кислоту, малеиновую кислоту, сорбиновую кислоту, аконитовую кислоту, салициловую кислоту, фталевую кислоту, эмболевую кислоту, энантовую кислоту и т.п. Кислотные по своей природе соединения способны образовывать соли с различными фармацевтически приемлемыми основаниями. Основания, которые можно использовать для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения основания таких кислотных соединений, представляют собой те, которые образуют нетоксичные соли присоединения основания, т.е. соли, содержащие фармакологически приемлемые катионы, такие как без ограничения соли щелочных или щелочноземельных металлов (в частности соли кальция, магния, натрия или калия). Подходящие органические основания включают без ограничения N,N-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, меглюмаин (N-метилглюкамин), лизин и прокаин.

[0096] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «сольват» означает соединение, раскрытое в настоящем документе, или его соль, которое дополнительно включает стехиометрическое или нестехиометрическое количество растворителя, связанного нековалентными межмолекулярными силами. Если растворителем является вода, сольват представляет собой гидрат.

[0097] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «сокристалл» означает кристаллическую форму, которая содержит более одного соединения в кристаллической решетке. Сокристаллы включают кристаллические молекулярные комплексы двух или более нелетучих соединений, связанных друг с другом в кристаллической решетке

посредством неионных взаимодействий. В контексте настоящего изобретения термин «сокристаллы» включает фармацевтические сокристаллы, где кристаллические молекулярные комплексы содержат терапевтическое соединение и одно или несколько дополнительных нелетучих соединений (называемых в настоящем документе контрмолекулой (контрмолекулами)). Контрмолекула в фармацевтическом сокристалле обычно представляет собой нетоксичную фармацевтически приемлемую молекулу, такую как, например, пищевые добавки, консерванты, фармацевтические вспомогательные вещества или другие активные фармацевтические ингредиенты (API). Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические сокристаллы улучшают определенные физико-химические свойства лекарственных препаратов (например, растворимость, скорость растворения, биодоступность и/или стабильность) без нарушения химической структурной целостности API. См., например, Jones *et al.*, *MRS Bulletin* 2006, 31,875-879, Trask, *Mol. Pharmaceutics* 2007, 4(3):301-309, Schultheiss & Newman, *Crystal Growth & Design* 2009, 9(6):2950-2967, Shan & Zaworotko, *Drug Discovery Today* 2008, 13(9/10):440-446, и Vishweshwar *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 2006, 95(3):499–516.

[0098] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «стереоизомер» охватывает все энантимерно/стереоизомерно чистые и энантимерно/стереоизомерно обогащенные соединения согласно настоящему изобретению.

[0099] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «стереоизомерно чистый» означает композицию, которая содержит один стереоизомер соединения и по существу не содержит других стереоизомеров этого соединения. Например, стереоизомерно чистая композиция соединения, имеющего один хиральный центр, по существу не будет содержать противоположный энантиомер соединения. Стереоизомерно чистая композиция соединения, имеющего два хиральных центра, по существу не будет содержать других диастереомеров соединения. Иллюстративное стереоизомерно чистое соединение содержит более приблизительно 80 масс.% одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 20 масс.% другого стереоизомера соединения, более предпочтительно более приблизительно 90 масс.% одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 10 масс.% другого стереоизомера соединения, даже более предпочтительно более приблизительно 95 масс.% одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 5 масс.% другого стереоизомера соединения, и наиболее предпочтительно более приблизительно 97 масс.% одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 3 масс.% другого стереоизомера соединения.

[00100] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «стереоизомерно обогащенный» означает композицию, которая содержит более приблизительно 60 масс.% одного стереоизомера соединения, предпочтительно более приблизительно 70 масс.%, более предпочтительно более приблизительно 80 масс.% одного стереоизомера соединения. В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «энантиомерно чистый» означает стереомерно чистую композицию соединения, имеющего один хиральный центр. Аналогичным образом, термин «стереоизомерно обогащенный» означает стереоизомерно обогащенную композицию соединения, имеющего один хиральный центр.

[00101] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «пролекарство» означает производное соединения, которое может гидролизаться, окисляться или иным образом реагировать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) с образованием соединения. Примеры пролекарств включают без ограничения производные Соединения, описанные в настоящем документе (например, Соединение 1), которые включают биогидролизуемые фрагменты, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые аналоги фосфатов.

[00102] Следует также отметить, что соединения могут содержать не существующие в природе доли атомных изотопов у одного или нескольких атомов. Например, соединения могут быть помечены радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий (^3H), йод-125 (^{125}I), сера-35 (^{35}S) или углерод-14 (^{14}C), или могут быть обогащены изотопами, как например дейтерием (^2H), углеродом-13 (^{13}C) или азотом-15 (^{15}N). В контексте настоящего изобретения термин «изотополог» представляет собой изотопно-обогащенное соединение. Термин «изотопно-обогащенный» относится к атому, имеющему изотопный состав, отличный от существующего в природе изотопного состава этого атома. «Изотопно-обогащенный» также может относиться к соединению, содержащему по меньшей мере один атом, изотопный состав которого отличается от существующего в природе изотопного состава этого атома. Термин «изотопный состав» относится к количеству каждого изотопа, присутствующего для данного атома. Соединения, меченные радиоактивным изотопом и изотопно-обогащенные, можно использовать в качестве терапевтических средств, *например*, терапевтических средств против рака и воспаления, исследовательских реагентов, *например*, реагентов для анализа связывания, и диагностических средств, *например*, средств визуализации *in vivo*. Предполагается, что все

изотопные варианты соединений, раскрытых в настоящем документе, независимо от того, являются ли они радиоактивными или нет, входят в объем вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к изотопологам соединений, например, изотопологи представляют собой соединения, обогащенные дейтерием, углеродом-13 или азотом-15. Согласно некоторым вариантам осуществления изотопологи, раскрытые в настоящем документе, представляют собой соединения, обогащенные дейтерием. Согласно некоторым вариантам осуществления изотопологи, раскрытые в настоящем документе, представляют собой соединения, обогащенные дейтерием, где дейтерирование происходит при хиральном центре. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к изотопологам соединений, раскрытых в настоящем документе, где дейтерирование происходит при хиральном центре. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к изотопологам Соединения D, где дейтерирование происходит при хиральном центре.

[00103] Термин «приблизительно» или «около» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, определяемую специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как значение измеряют или определяют. Согласно определенным вариантам осуществления термин «приблизительно» или «около» означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений. Согласно определенным вариантам осуществления термин «приблизительно» или «около» означает в пределах 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,05% от заданного значения или диапазона.

[00104] Следует отметить, что если имеется несоответствие между изображенной структурой и названием, приведенным для этой структуры, изображенной структуре следует придавать большее значение. Кроме того, если стереохимия структуры или части структуры не указана, например, жирными или пунктирными линиями, структура или часть структуры должна интерпретироваться как включающая все ее стереоизомеры.

[00105] При осуществлении в практическом применении вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, используют без ограничения обычные способы молекулярной биологии, микробиологии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие способы полностью описаны в литературе. Примеры особенно подходящих документов для консультации включают следующие: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed. 2014),

Glover, ed., DNA Cloning, Volumes I and II (2nd ed. 1995), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London), Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer Verlag, N.Y., 3rd ed. 1993), и Weir & Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (5th ed. 1996).

5.2. Наборы генов, биомаркеры и способы их применения

5.2.1 Наборы генов

[00106] Раскрытые в настоящем документе способы частично основаны на обнаружении того, что обнаруживаемое повышение уровня экспрессии определенных наборов генов (или генных сигнатур) наблюдается у субъектов, страдающих раком (*например*, гематологической злокачественной опухолью, такой как лимфома, ММ или лейкоз), которые отвечают на данное лечение, например, соединение, такое как Соединение D, или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, таутомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват, изотополог, пролекарство, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, и что уровень экспрессии набора генов может быть использован для прогноза ответа субъектов на лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение является таким, как раскрыто в настоящем документе в Разделе 5.5. Согласно одному варианту осуществления соединение представляет собой Соединение D.

[00107] Согласно определенным вариантам осуществления набор генов представляет собой генную сигнатуру, которая содержит множество генов, которые связаны своей ассоциацией с определенными типами клеток, биологическими функциями, фенотипами или клеточными путями и т.д. Например, согласно одному конкретному варианту осуществления гены в пределах генной сигнатуры связаны их ассоциацией со стволовыми клетками или подгруппой стволовых клеток (*например*, LSC).

[00108] Согласно некоторым вариантам осуществления генная сигнатура содержит по меньшей мере один ген, выбранный из группы генов, которые связаны своей ассоциацией с определенными типами клеток, биологическими функциями или клеточными путями и т.д. Согласно другому варианту осуществления сигнатура содержит два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, двадцать, тридцать, сорок, пятьдесят или все гены, выбранные из группы связанных генов.

[00109] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего раком, который вероятно будет отвечать на лечение,

предусматривающее соединение, раскрытое в настоящем документе, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего раком, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему: i. взятие образца у субъекта, ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце, iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня, где соединение для лечения представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00110] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего раком, соединением, предусматривающему идентификацию субъекта, страдающего раком, который может отвечать на лечение, предусматривающее соединение, с применением способов, раскрытых в настоящем документе (например, описанных выше), и введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение.

[00111] Согласно определенным вариантам осуществления раком является гематологическая злокачественная опухоль. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лимфому. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой лейкоз. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой MM. Согласно конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой ALL. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой AML. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой CLL. Согласно другому варианту осуществления лейкоз представляет собой CML.

[00112] Согласно некоторым вариантам осуществления AML является рецидивирующим. Согласно определенным вариантам осуществления AML является невосприимчивым. Согласно другим вариантам осуществления AML является устойчивым к обычной терапии.

[00113] Согласно конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего AML, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, раскрытое в настоящем документе, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему: i. взятие образца у субъекта, ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце, iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня, где соединение для лечения представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00114] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего раком, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего раком, на соединение для лечения. Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака соединением для лечения. Согласно другим вариантам осуществления рак характеризуется повышенным уровнем сигнатуры LSC (или более высокой оценкой сигнатуры LSC). Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC представляет собой сигнатуру LSC, описанную в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC (или более высокой оценкой сигнатуры LSC), как описано в настоящем документе, соединением для лечения. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения лейкоза, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC (или более высокой оценкой сигнатуры LSC), как описано в настоящем документе, соединением для лечения. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC (или более высокой оценкой сигнатуры LSC), как описано в настоящем документе, соединением для лечения.

[00115] Согласно определенным вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, контрольный уровень (контрольный уровень оценки сигнатуры LSC) представляет собой уровень сигнатуры LSC (или оценки сигнатуры LSC) в контроле. Согласно некоторым вариантам осуществления контроль получают от здорового субъекта, не страдающего раком. Согласно другим вариантам осуществления контроль получают у субъекта, имеющего рак, но с хорошим прогнозом риска. Согласно другим вариантам осуществления контроль получают у субъекта, страдающего раком, и рак был улучшен или излечен с помощью лечения, отличного от введения субъекту соединений для лечения, описанных в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления контроль получают у субъекта, страдающего раком, но не отвечающего на соединение для лечения. Согласно другим вариантам осуществления контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови), что и образец. Согласно другим вариантам осуществления контролем является клеточная линия (например, клеточная линия AML). Согласно одному варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который получен у здорового субъекта, не страдающего раком, и контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови), что и образец. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который получен у субъекта, страдающего раком, но с хорошим прогностическим риском, и контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови), что и образец. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который получен у субъекта, страдающего раком, и рак был улучшен или вылечен с помощью лечения, отличного от введения субъекту соединений для лечения, описанных в настоящем документе, и контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови), что и образец. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который получен у субъекта, страдающего раком, но который не отвечает на соединение для лечения, и контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови), что и образец. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень представляет собой клеточную линию. Согласно другому варианту осуществления

контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контрольной клеточной линии, полученной из того же источника клеток (например, белых кровяных телец, бластных клеток и т.д.), что и рак. Согласно одному варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который представляет собой клеточную линию. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень представляет собой уровень сигнатуры LSC в контроле, который представляет собой клеточную линию AML. Согласно другому варианту осуществления контрольный уровень (или эталонную оценку сигнатуры LSC) определяют на основе оценки сигнатур LSC полученных для популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления эталонную оценку сигнатуры LSC определяют заранее.

[00116] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее получал лечение до способов, раскрытых в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления предшествующее лечение представляет собой лечение, отличное от введения субъекту того же соединения для лечения как в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления предшествующее лечение предусматривает введение субъекту того же соединения для лечения как в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления предшествующее лечение предусматривает то же соединение для лечения с тем же режимом введения дозы как в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления предшествующее лечение предусматривает то же соединение для лечения с другим режимом введения дозы (например, другое количество и/или частота введения соединения для лечения) по сравнению со способами, раскрытыми в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект получил предварительное лечение до способов, раскрытых в настоящем документе, контроль получают у того же субъекта до предварительного лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контроль происходит из той же ткани или источника клеток (например, крови или определенных клеток крови) до предварительного лечения, что и образец. Согласно некоторым вариантам осуществления предварительное лечение представляет собой одно или несколько агентов, выбранных из группы, состоящей из даунорубицина, цитарабина (ara-C) и гемтузумаба озогамидина, или устойчиво к химиотерапии.

[00117] Согласно определенным вариантам осуществления набор генов содержит генную сигнатуру, связанную с определенными типами клеток (например, стволовыми

клетками. Согласно некоторым вариантам осуществления набор генов содержит генную сигнатуру, связанную с определенными биологическими функциями (например, метаболизмом белков). Согласно другим вариантам осуществления набор генов содержит генную сигнатуру, связанную с определенными клеточными путями (например, путем UPR). Согласно одному варианту осуществления набор генов содержит генную сигнатуру, связанную с лейкозными стволовыми клетками (LSC). Согласно другому варианту осуществления набор генов содержит генную сигнатуру LSC.

[00118] Согласно некоторым вариантам осуществления генная сигнатура LSC содержит один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56, AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4, GATA2, SLC25A37, SGK, LOC652694, ITPR3, LOC654103, CXCR4, FCRL3, RBM38, LILRA5, IL18RAP, CCDC109B, ISG20, MTSS1, CECR1, ADAM19, FCGR2A, AIM2, NPL, IL10RA, CTSL1, GNLY, CKAP4, ADM, KLRB1, SLC15A3, FGR, FCRLA, IL2RB, CXCL16, SLC4A1, GZMH, FLJ22662, LOC647506, GIMAP4, JAZF1, CTSH, GZMA, CHST15, AQP9, CD247, BCL6, SLC7A7, E2F2, LOC647450, GZMB, LOC652493, HBM, CD14, ALAS2, HBB, LOC642113, AHSP, FCN1, CD48, HBA2 и HBA1.

[00119] Согласно другим вариантам осуществления генная сигнатура LSC содержит один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56, AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4 и GATA2.

[00120] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит по меньшей мере один ген, выбранный из Таблицы 1.

Таблица 1. Сигнатура LSC17

AKR1C3

ARHGAP22
CD34
CDK6
CPXM1
DNMT3B
DPYSL3
EMP1
GPR56
KIAA0125
LAPTM4B
MMRN1
NGFRAP1
NYNRIN
SMIM24
SOCS2
ZBTB46

[00121] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит по меньшей мере один ген, выбранный из группы, состоящей из AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит AKR1C3. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит ARHGAP22. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит CD34. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит CDK6. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит CPXM1. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит DNMT3B. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит DPYSL3. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит EMP1. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит GPR56. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит KIAA0125. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит LAPTM4B. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит MMRN1. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит NGFRAP1. Согласно

одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит NYNRIN. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит SMIM24. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит SOCS2. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит ZBTB46.

[00122] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит два гена, выбранные из Таблицы 1. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC содержит три гена, выбранные из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит четыре гена, выбранные из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит пять генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит шесть генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит семь генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC содержит восемь генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит девять генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит десять генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит двенадцать генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит четырнадцать генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC содержит шестнадцать генов, выбранных из Таблицы 1. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC содержит все семнадцать генов, выбранных из Таблицы 1, которые упоминаются как «LSC17» или «сигнатура LSC17».

[00123] Согласно некоторым вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC (оценка LSC17) вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B × масса DNMT3B) + (уровень экспрессии ZBTB46 × масса ZBTB46) + (уровень экспрессии NYNRIN × масса NYNRIN) + (уровень экспрессии ARHGAP22 × масса ARHGAP22) + (уровень экспрессии LAPTM4B × масса LAPTM4B) + (уровень экспрессии MMRN1 × масса MMRN1) + (уровень экспрессии DPYSL3 × масса DPYSL3) + (уровень экспрессии KIAA0125 × масса KIAA0125) + (уровень экспрессии CDK6 × масса CDK6) + (уровень экспрессии CPXM1 × масса CPXM1) + (уровень экспрессии SOCS2 × масса SOCS2) + (уровень экспрессии SMIM24 × масса SMIM24) + (уровень экспрессии EMP1 × масса EMP1) + (уровень экспрессии NGFRAP1 × масса NGFRAP1) + (уровень экспрессии CD34 × масса CD34) + (уровень экспрессии AKR1C3

$\times$ масса AKR1C3) + (уровень экспрессии GPR56 $\times$ масса GPR56), и масса DNMT3B находится в диапазоне от 0,06 до 0,1, масса ZBTB46 находится в диапазоне от $-0,05$ до $-0,01$, масса NYNRIN находится в диапазоне от $-0,01$ до 0,03, масса ARHGAP22 находится в диапазоне от $-0,03$ до 0,01, масса LAPTM4B находится в диапазоне от $-0,015$ до 0,025, масса MMRN1 находится в диапазоне от 0,005 до 0,045, масса DPYSL3 находится в диапазоне от 0,01 до 0,05, масса KIAA0125 находится в диапазоне от 0,009 до 0,039, масса CDK6 находится в диапазоне от $-0,09$ до $-0,05$, масса CPXM1 находится в диапазоне от $-0,045$ до $-0,005$, масса SOCS2 находится в диапазоне от 0,007 до 0,047, масса SMIM24 находится в диапазоне от $-0,043$ до $-0,003$, масса EMP1 находится в диапазоне от 0,01 до 0,035, масса NGFRAP1 находится в диапазоне от 0,025 до 0,065, масса CD34 находится в диапазоне от 0,01 до 0,05, масса AKR1C3 находится в диапазоне от $-0,06$ до $-0,02$, и масса GPR56 находится в диапазоне от 0,03 до 0,07.

[00124] Согласно некоторым вариантам осуществления масса DNMT3B находится в диапазоне от 0,08 до 0,09, масса ZBTB46 находится в диапазоне от $-0,03$ до $-0,04$, масса NYNRIN находится в диапазоне от $-0,008$ до 0,009, масса ARHGAP22 находится в диапазоне от $-0,015$ до 0,01, масса LAPTM4B находится в диапазоне от $-0,006$ до 0,005, масса MMRN1 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса DPYSL3 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса KIAA0125 находится в диапазоне от 0,01 до 0,02, масса CDK6 находится в диапазоне от $-0,08$ до $-0,07$, масса CPXM1 находится в диапазоне от $-0,02$ до $-0,03$, масса SOCS2 находится в диапазоне от 0,02 до 0,03, масса SMIM24 находится в диапазоне от $-0,02$ до $-0,03$, масса EMP1 находится в диапазоне от 0,014 до 0,02, масса NGFRAP1 находится в диапазоне от 0,04 до 0,05, масса CD34 находится в диапазоне от 0,03 до 0,04, масса AKR1C3 находится в диапазоне от $-0,04$ до $-0,05$, и масса GPR56 находится в диапазоне от 0,04 до 0,055.

[00125] Согласно некоторым вариантам осуществления масса DNMT3B составляет приблизительно 0,0874, масса ZBTB46 составляет приблизительно $-0,0347$, масса NYNRIN составляет приблизительно 0,00865, масса ARHGAP22 составляет приблизительно $-0,0138$, масса LAPTM4B составляет приблизительно 0,00582, масса MMRN1 составляет приблизительно 0,0258, масса DPYSL3 составляет приблизительно 0,0284, масса KIAA0125 составляет приблизительно 0,0196, масса CDK6 составляет приблизительно $-0,0704$, масса CPXM1 составляет приблизительно $-0,0258$, масса SOCS2 составляет приблизительно 0,0271, масса SMIM24 составляет приблизительно $-0,0226$, масса EMP1 составляет приблизительно 0,0146, масса NGFRAP1 составляет приблизительно 0,0465, масса CD34 составляет

приблизительно 0,0338, масса AKR1C3 составляет приблизительно – 0,0402, и масса GPR56 составляет приблизительно 0,0501.

[00126] Согласно конкретному варианту осуществления оценку сигнатуры LSC (оценка LSC17) вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B $\times$ 0,0874) + (уровень экспрессии ZBTB46 $\times$ – 0,0347) + (уровень экспрессии NYNRIN $\times$ 0,00865) + (уровень экспрессии ARHGAP22 $\times$ – 0,0138) + (уровень экспрессии LAPTM4B $\times$ 0,00582) + (уровень экспрессии MMRN1 $\times$ 0,0258) + (уровень экспрессии DPYSL3 $\times$ 0,0284) + (уровень экспрессии KIAA0125 $\times$ 0,0196) + (уровень экспрессии CDK6 $\times$ – 0,0704) + (уровень экспрессии CPXM1 $\times$ – 0,0258) + (уровень экспрессии SOCS2 $\times$ 0,0271) + (уровень экспрессии SMIM24 $\times$ – 0,0226) + (уровень экспрессии EMP1 $\times$ 0,0146) + (уровень экспрессии NGFRAP1 $\times$ 0,0465) + (уровень экспрессии CD34 $\times$ 0,0338) + (уровень экспрессии AKR1C3 $\times$ – 0,0402) + (уровень экспрессии GPR56 $\times$ 0,0501).

[00127] Согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень составляет 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2.

[00128] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит по меньшей мере один ген, выбранный из TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит TNFRSF4. Согласно одному варианту осуществления сигнатура LSC содержит SLC4A1. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит SLC7A7. Согласно другому варианту осуществления сигнатура LSC содержит AIM2.

[00129] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит два гена, выбранные из TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC содержит три гена выбранные из TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC состоит из TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2, которая упоминается как LSC4 или сигнатура LSC4.

[00130] Согласно некоторым вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC (оценку сигнатуры LSC4) вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии TNFRSF4 $\times$ масса TNFRSF4) + (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ масса SLC4A1) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ масса SLC7A7) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ масса AIM2), и где масса TNFRSF4 находится в диапазоне от – 2 до – 1, масса SLC4A1 находится в диапазоне от 11 до 15, масса SLC7A7 находится в диапазоне от – 5,5 до – 1,5, масса AIM2 находится в диапазоне от – 5 до – 1.

[00131] Согласно некоторым вариантам осуществления масса TNFRSF4 находится в диапазоне от $-1,5$ до -1 , масса SLC4A1 находится в диапазоне от 13 до 14 , масса SLC7A7 находится в диапазоне от -4 до -3 , масса AIM2 находится в диапазоне от -3 до -4 .

[00132] Согласно некоторым вариантам осуществления масса TNFRSF4 составляет приблизительно $-1,13$, масса SLC4A1 составляет приблизительно $13,59$, масса SLC7A7 составляет приблизительно $-3,57$, и масса AIM2 составляет приблизительно $-3,04$.

[00133] Согласно конкретному варианту осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии TNFRSF4 $\times -1,13$) + (уровень экспрессии SLC4A1 $\times 13,59$) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times -3,57$) + (уровень экспрессии AIM2 $\times -3,04$).

[00134] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит по меньшей мере один ген, выбранный из SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит два гена, выбранные из SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC состоит из SLC4A1, SLC7A7 и AIM2, которая упоминается как LSC3 или сигнатура LSC3.

[00135] Согласно некоторым вариантам осуществления оценку сигнатуры LSC (оценку сигнатуры LSC3) вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ масса SLC4A1) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ масса SLC7A7) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ масса AIM2), и где масса SLC4A1 находится в диапазоне от 11 до 15 , масса SLC7A7 находится в диапазоне от $-5,5$ до $-1,5$, масса AIM2 находится в диапазоне от -5 до -1 .

[00136] Согласно некоторым вариантам осуществления масса SLC4A1 находится в диапазоне от 13 до 14 , масса SLC7A7 находится в диапазоне от -4 до -3 , масса AIM2 находится в диапазоне от -3 до -4 .

[00137] Согласно некоторым вариантам осуществления масса SLC4A1 составляет приблизительно $13,59$, масса SLC7A7 составляет приблизительно $-3,57$, и масса AIM2 составляет приблизительно $-3,04$.

[00138] Согласно конкретному варианту осуществления оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии SLC4A1 $\times 13,59$) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times -3,57$) + (уровень экспрессии AIM2 $\times -3,04$).

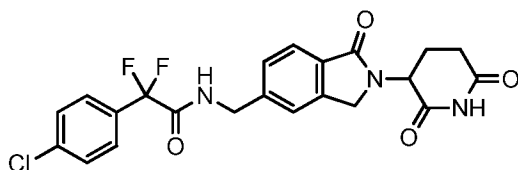
[00139] Согласно некоторым вариантам осуществления способ, раскрытый в настоящем документе, предусматривает определение пациента, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, раскрытое в настоящем документе, если

оценка сигнатуры LSC в образце составляет приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, в приблизительно 2 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 50 раз или приблизительно 100 раз выше контрольной оценки сигнатуры LSC. Согласно некоторым вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC представляет собой оценку сигнатура LSC17. Согласно некоторым вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC представляет собой оценку сигнатура LSC4. Согласно другим вариантам осуществления оценка сигнатуры LSC представляет собой оценку сигнатура LSC3.

5.2.2 Маркеры клеточной поверхности

[00140] Как показано в разделе 6 ниже, лечение соединениями согласно настоящему изобретению (например, Соединением D) индуцирует сокращение или увеличение определенного типа клеток с определенными клеточными маркерами. Например, доля зародышевых клеток и/или доля дифференцированных лейкозных клеток изменяется при лечении Соединением D. Следовательно, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу прогнозирования отвечаемости на соединение для лечения (например, Соединение D или его стереоизомер, или смесь стереоизомеров, таутомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват, изотополог, пролекарство, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф) на основе сокращения или увеличения определенных типов клеток или связанных с ними маркеров клеточной поверхности.

[00141] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего раком, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего раком, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему: i. взятие образца у субъекта, ii. введение соединения в образец, iii. измерение доли одного или нескольких типов клеток, iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если доля одного или нескольких типов клеток отлична от контрольной доли клеток, где соединение для лечения представляет собой 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид (Соединение D), которое имеет следующую структуру:



или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00142] Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение.

[00143] Согласно некоторым вариантам осуществления контрольная доля типа клеток представляет собой долю типа клеток в образце до введения соединения. Согласно другим вариантам осуществления контрольная доля типа клеток представляет собой предварительно определенную долю. Согласно другим вариантам осуществления контрольная доля типа клеток представляет собой долю типа клеток в образце, взятом у субъекта, который не отвечает на соединение для лечения.

[00144] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли зародышевых клеток и/или доли дифференцированных лейкозных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления сокращение доли зародышевых клеток по сравнению с долей до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение. Согласно другим вариантам осуществления увеличение доли дифференцированных лейкозных клеток по сравнению с долей до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[00145] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает измерение и сравнение доли CD34⁺, CD15⁺ клеток, CD14⁺ клеток, и/или CD11b⁺ клеток до и после введения соединения в образец.

[00146] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли CD34⁺ клеток, и где сокращение доли CD34⁺ клеток по сравнению с долей CD34⁺ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[00147] Согласно другим вариантам осуществления способ предусматривает измерение доли CD15⁺ клеток и/или CD14⁺ клеток, и где увеличение доли CD15⁺ клеток и/или

CD14+ клеток по сравнению с долей CD15+ клеток и/или CD14+ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[00148] Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего раком, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего раком, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающему: i. взятие образца у субъекта, ii. введение соединения в образец, iii. измерение уровня одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень одного или нескольких маркеров клеточной поверхности отличается от контрольного уровня, где соединение для лечения представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00149] Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько маркеров клеточной поверхности выбраны из группы, состоящей из CD34, CD15, CD14 и CD11b.

[00150] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает измерение уровня CD34 до и после введения соединения (например, Соединение D), и сокращение уровня CD34 после введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[00151] Согласно другим вариантам осуществления способ предусматривает измерение уровня CD15 и/или CD14 до и после введения соединения (например, Соединения D), и увеличение уровня CD15 и/или CD14 после введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

[00152] Способы определения доли типа клеток с определенными маркерами клеточной поверхности и способы определения уровня маркера клеточной поверхности в образце известны в области техники. Иллюстративные способы приведены в разделе 6 ниже.

[00153] Согласно некоторым вариантам осуществления увеличение означает увеличение на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с контролем. Согласно некоторым вариантам осуществления сокращение

означает уменьшение на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с контролем.

[00154] Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак крови. Согласно одному варианту осуществления раком крови является лимфома. Согласно другому варианту осуществления раком крови является лейкоз. Согласно другому варианту осуществления раком крови является ММ. Согласно конкретному варианту осуществления лейкозом является ALL. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкозом является AML. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкозом является CLL. Согласно другому варианту осуществления лейкозом является CML.

[00155] Согласно некоторым вариантам осуществления AML является рецидивирующим. Согласно определенным вариантам осуществления AML является невосприимчивым. Согласно другим вариантам осуществления AML является устойчивым к обычной терапии.

[00156] Согласно конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего AML, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, раскрытое в настоящем документе, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение, с применением способов, описанных выше.

5.2.3 Селективные лечения

[00157] Согласно некоторым вариантам осуществления различных способов, раскрытых в настоящем документе (включая описанные выше), соединение, раскрытое в настоящем документе, вводят пациенту, который был определен как вероятно отвечающий на лечение. Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к селективному способу лечения, предусматривающему введение соединения пациенту, который был определен как вероятно отвечающий на лечение, на основе способов, описанных в настоящем документе (включая описанные выше).

[00158] Согласно другому конкретному варианту осуществления соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00159] Согласно некоторым вариантам осуществления различных способов, раскрытых в настоящем документе, соединение для лечения вводят пациенту, который вероятно будет отвечать на соединение для лечение. Настоящее изобретение также относится к способам лечения пациентов, которые ранее получали лечение от рака, но не отвечают на стандартную терапию, а также пациентов, которых ранее не получали лечение. Настоящее изобретение также охватывает способы лечения пациентов независимо от возраста пациента, хотя некоторые заболевания или нарушения чаще встречаются в определенных возрастных группах. Настоящее изобретение дополнительно охватывает способы лечения пациентов, перенесших хирургическое вмешательство с целью лечения рассматриваемого заболевания или состояния, а также пациентов, которые не подвергались хирургическому вмешательству. Поскольку пациенты, страдающие раком, имеют гетерогенные клинические проявления и различные клинические исходы, лечение, назначаемое пациенту, может варьироваться в зависимости от его/ее прогноза. Квалифицированный клиницист может легко определить без излишних экспериментов конкретные вторичные агенты, типы хирургического вмешательства и типы немедикаментозной стандартной терапии, которые можно эффективно использовать для лечения отдельного пациента, страдающего раком.

[00160] Доза и введение

[00161] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к терапевтическому или профилактическому количеству соединения, раскрытого в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество Соединения D составляет от приблизительно 0,005 до приблизительно 20 мг в день, от приблизительно 0,05 до 20 мг в день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг в день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 7 мг в день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг в день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 3 мг в день, от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мг в день, от приблизительно 0,05 до приблизительно 7 мг в день, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 мг в день, от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг в день, от приблизительно 0,1 до приблизительно 15 мг в день, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг в день, от приблизительно 0,1 до приблизительно 7 мг в день, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг в день, от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 мг в день, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг в день, от

[00162] Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,5, приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9 или приблизительно 10 мг в день. Согласно некоторым таким вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,75, приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6 или приблизительно 7 мг в день. Согласно некоторым таким вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 0,6, приблизительно 1,2, приблизительно 1,8, приблизительно 2,4 или приблизительно 3,6 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически

эффективное количество составляет приблизительно 0,1 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 0,2 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 0,5 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 1 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 2 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 3 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 4 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 5 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 6 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 7 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 8 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 9 мг в день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет приблизительно 10 мг в день.

[00163] Согласно одному варианту осуществления рекомендованный ежедневный диапазон дозы Соединения D для состояний, описанных в настоящем документе, лежит в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 20 мг в день, предпочтительно вводится в виде однократной дозы один раз в день или в виде разделенных доз в течение дня. Согласно одному варианту осуществления рекомендованный ежедневный диапазон дозы Соединения D для состояний, описанных в настоящем документе, лежит в диапазоне от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 15 мг в день, предпочтительно вводится в виде однократной дозы один раз в день или в виде разделенных доз в течение дня. Согласно одному варианту осуществления рекомендованный ежедневный диапазон дозы Соединения D для состояний, описанных в настоящем документе, лежит в диапазоне от приблизительно 0,01 мг

до приблизительно 12 мг в день, предпочтительно вводится в виде однократной дозы один раз в день или в виде разделенных доз в течение дня. Согласно некоторым вариантам осуществления доза находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 10 мг в день. Согласно другим вариантам осуществления доза находится в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг в день. Конкретные дозы в день включают 0,1, 0,2, 0,5, 0,6, 1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,5, 3,6, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,2, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,4, 14,5 или 15 мг в день. Согласно другим вариантам осуществления доза находится в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг в день. Конкретные дозы в день включают 0,1, 0,2, 0,5, 0,6, 1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,5, 3,6, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 0,1 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 0,2 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 0,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 0,6 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 1 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 1,2 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 1,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 1,8 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 2 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 2,4 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 2,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 3 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 3,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 3,6 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 4 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 4,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 5,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 6 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 6,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 7 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 7,2 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 7,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 8 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 8,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 9 мг в день. Согласно одному

варианту осуществления доза в день составляет 9,5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 10 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 12 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 10 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 12 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 14,4 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза в день составляет 15 мг в день.

[00164] Согласно конкретному варианту осуществления рекомендованная начальная доза может составлять 0,1, 0,5, 0,6, 0,7, 1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,4, 2,5, 3, 3,5, 3,6, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7 мг в день. Согласно другому варианту осуществления рекомендованная начальная доза может составлять 0,1, 0,5, 0,6, 1, 1,2, 1,8, 2, 2,4, 3, 3,6, 4 или 5 мг в день. Согласно одному варианту осуществления доза может быть увеличена до 7, 8, 9 10, 12 или 15 мг/день. Согласно одному варианту осуществления доза может быть увеличена до 7, 8, 9 или 10 мг/день.

[00165] Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 0,1 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 1 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 3 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 4 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 5 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 6 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 7 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 10 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 12 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем

документе, можно вводить в количестве приблизительно 15 мг/день пациентам с лейкемией, включая AML.

[00166] Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 0,1 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 1 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 3 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D можно вводить в количестве приблизительно 4 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 5 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 6 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 7 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 10 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 12 мг/день пациентам с MDS. Согласно конкретному варианту осуществления Соединение D, раскрытое в настоящем документе, можно вводить в количестве приблизительно 15 мг/день пациентам с MDS.

[00167] Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 15 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 9 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 8 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 7 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 6 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 4 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 3 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 2 мг/кг/день, от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 мг/кг/день или от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,05 мг/кг/день. Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 20 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 15 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 9 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 8 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 7 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 6 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 4 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 3 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 2 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 мг/кг/день.

Согласно определенным вариантам осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,05 мг/кг/день.

[00168] Вводимая доза также может быть выражена в единицах, отличных от мг/кг/день. Например, дозы для парентерального введения могут быть выражены в мг/м²/день. Специалисту в данной области техники известно, как преобразовать дозы из мг/кг/день в мг/м²/день с учетом либо роста, либо массы субъекта, либо и того и другого (см. www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm). Например, доза 1 мг/кг/день для человека массой 65 кг приблизительно равна 38 мг/м²/день.

[00169] Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 500 мкМ, от приблизительно 0,002 до приблизительно 200 мкМ, от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мкМ, от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 0,02 до приблизительно 25 мкМ, от приблизительно 0,05 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мкМ или от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкМ. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 500 мкМ, от приблизительно 0,002 до приблизительно 200 мкМ, от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мкМ, от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 0,02 до приблизительно 25 мкМ, от приблизительно 0,05 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мкМ или от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкМ.

[00170] Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 100 нМ, приблизительно 5 до приблизительно 50 нМ, приблизительно 10 до приблизительно 100 нМ, приблизительно 10 до приблизительно 50 нМ или от приблизительно 50 до приблизительно 100 нМ. Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 100 нМ. Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 50 нМ. Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 10 до

приблизительно 100 нМ. Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 50 нМ. Согласно другим вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения концентрации в плазме соединения в равновесном состоянии, находящейся в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 100 нМ.

[00171] В контексте настоящего изобретения термин «концентрация в плазме в равновесном состоянии» означает концентрацию, достигаемую после периода введения состава, раскрытого в настоящем документе. После достижения равновесного состояния на кривой зависимости концентрации в плазме твердой формы от времени появляются небольшие пики и впадины.

[00172] Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения максимальной концентрации в плазме (пиковой концентрации) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 500 мкМ, от приблизительно 0,002 до приблизительно 200 мкМ, от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мкМ, от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мкМ, от приблизительно 0,02 до приблизительно 25 мкМ, от приблизительно 0,05 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мкМ, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мкМ или от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкМ. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения максимальной концентрации в плазме (пиковой концентрации) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 500 мкМ. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения максимальной концентрации в плазме (пиковой концентрации) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,002 до приблизительно 200 мкМ. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения максимальной концентрации в плазме (пиковой концентрации) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,005 до приблизительно 100 мкМ. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения максимальной

[00174] Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения площади под кривой (AUC) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 100000

нг*ч/мл, от приблизительно 1000 до приблизительно 50000 нг*ч/мл, от приблизительно 5000 до приблизительно 25000 нг*ч/мл или от приблизительно 5000 до приблизительно 10000 нг*ч/мл. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения площади под кривой (AUC) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 100 до приблизительно 100000 нг*ч/мл. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения площади под кривой (AUC) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 50000 нг*ч/мл. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения площади под кривой (AUC) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 5000 до приблизительно 25000 нг*ч/мл. Согласно определенным вариантам осуществления вводимое количество состава Соединения D является достаточным для обеспечения площади под кривой (AUC) соединения, находящейся в диапазоне от приблизительно 5000 до приблизительно 10000 нг*ч/мл.

[00175] Согласно определенным вариантам осуществления пациент, который подлежит лечению одним из способов, раскрытых в настоящем документе, не получал противораковую терапию до введения состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления пациент, подлежащий лечению одним из способов, раскрытых в настоящем документе, получал противораковую терапию до введения состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления у пациента, подлежащего лечению одним из раскрытых в настоящем документе способов, развилась лекарственная устойчивость к противораковой терапии.

[00176] Способы, раскрытые в настоящем документе, охватывают лечение пациента независимо от его возраста, хотя некоторые заболевания или нарушения более распространены в определенных возрастных группах.

[00177] Состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, может быть доставлен в виде однократной дозы, такой как, например, однократная болюсная инъекция, или в течение времени, например, в виде непрерывной инфузии с течением времени или разделенных болюсных доз с течением времени. Состав Соединения D можно вводить повторно, если это необходимо, например, до тех пор, пока у пациента не наступит стабилизация заболевания или регресс, или пока у пациента не возникнет прогрессирование заболевания или неприемлемая токсичность. Например, стабильное заболевание солидных

опухолей в общем означает, что перпендикулярный диаметр измеримых поражений не увеличился на 25% или более по сравнению с последним измерением. Критерии оценки ответа приведены в Руководстве по солидным опухолям (RECIST), *Journal of the National Cancer Institute* 92(3): 205-216 (2000). Стабильное заболевание или его отсутствие определяют способами, известными в данной области техники, такими как оценка симптомов пациента, физикальное обследование, визуализация опухоли, которая была визуализирована с помощью рентгена, компьютерной томографии, ПЭТ или МРТ, и других общепринятых способов оценки.

[00178] Состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, можно вводить один раз в день (QD) или разделять на многократные суточные дозы, такие как два раза в день (BID), три раза в день (TID) и четыре раза в день (QID). Кроме того, введение может быть непрерывным (т.е. ежедневно в течение последовательных дней или каждый день), периодическим, например, циклами (т.е. включая дни, недели или месяцы отдыха от лекарственного средства). В контексте настоящего изобретения термин «ежедневно» означает, что терапевтическое соединение вводят один или несколько раз в день, например, в течение определенного периода времени. Термин «непрерывное» означает, что терапевтическое соединение вводят ежедневно в течение непрерывного периода времени от по меньшей мере 10 дней до 52 недель. В контексте настоящего изобретения термин «периодическое» или «периодически» предназначен для обозначения остановки и начала либо с регулярными, либо с нерегулярными интервалами. Например, периодическое введение состава Соединения D представляет собой введение от одного до шести дней в неделю, введение циклами (например, ежедневное введение в течение одного-десяти дней подряд 28-ми дневного цикла, затем период отдыха без введения в течение остальной части 28-ми дневного цикла, или ежедневное введение в течение двух-восьми недель подряд, затем период отдыха без введения до одной недели) или введение через день. Циклическая терапия Соединением D раскрыта в другой части настоящего документе.

[00179] Согласно некоторым вариантам осуществления частота введения находится в диапазоне от приблизительно дневной дозы до приблизительно месячной дозы. Согласно определенным вариантам осуществления введение проводят один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день, один раз через день, два раза в неделю, один раз каждую неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. Согласно одному варианту осуществления Соединение D вводят один раз в день. Согласно другому варианту осуществления Соединение D вводят два раза в день. Согласно другому

вводят один раз в день в течение трех недель. Согласно другому варианту осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят один раз в день в течение четырех недель.

[00181] Комбинированная терапия

[00182] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики и/или контроля рака, предусматривающему введение пациенту Соединения D в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK, и необязательно в комбинации с лучевой терапией, переливанием крови или хирургическим вмешательством. Примеры вторых активных агентов раскрыты в настоящем документе.

[00183] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики и/или контроля рака, предусматривающему введение пациенту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, и необязательно в комбинации с лучевой терапией, переливанием крови или хирургическим вмешательством. Примеры вторых активных агентов раскрыты в настоящем документе.

[00184] В контексте настоящего изобретения термин «в комбинации» включает использование более одной терапии (например, одного или более профилактических и/или терапевтических средств). Однако использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства (например, профилактические и/или терапевтические средства) вводят пациенту с заболеванием или нарушением. Например, «в комбинации» может включать введение в виде смеси, одновременное введение с использованием отдельных составов и последовательное введение в любом порядке. «Последовательное» означает, что между введением активных агентов прошло определенное время. Например, «последовательное» может означать, что между введением отдельных активных агентов прошло более 10 минут. Тогда период времени может составлять более 10 минут, более 30 минут, более 1 часа, более 3 часов, более 6 часов или более 12 часов. Например, первая терапия (например, профилактическое или терапевтическое средство, такое как состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе) может быть введена до (например, за 5

минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно с или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второй терапии (например, профилактического или терапевтического средства) субъекту. Настоящее изобретение также охватывает тройную терапию.

[00185] Согласно одному варианту осуществления введение Соединения D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, и одного или нескольких вторых активных агентов пациенту может происходить одновременно или последовательно одним и тем же или разными путями введения. Согласно одному варианту осуществления введение Соединения D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, и одного или нескольких вторых активных агентов пациенту может происходить одновременно или последовательно одним и тем же или разными путями введения. Пригодность конкретного пути введения, используемого для конкретного активного агента, будет зависеть от самого активного агента (например, можно ли его вводить перорально без разложения до попадания в кровотоки) и от вида рака, который подлежит лечению.

[00186] Путь введения Соединения D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, не зависит от пути введения второй терапии. Таким образом, согласно одному варианту осуществления Соединение D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят внутривенно, и вторую терапию можно вводить перорально, парентерально, внутрибрюшинно, внутривенно, внутриартериально, чрескожно, сублингвально, внутримышечно, ректально, трансбуккально, интраназально, липосомально, ингаляционно, вагинально, внутриглазным способом, посредством местной доставки через катетер или стент, подкожно, интраадипозально, внутрисуставно, подболобочечно или в лекарственной форме с медленным высвобождением. Согласно одному варианту осуществления Соединение D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, и вторую терапию вводят одним и тем же способом введения, внутривенно. Согласно другому варианту осуществления Соединение D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят одним способом введения, например, внутривенно, тогда как второй агент (противораковое средство) вводят другим способом введения, например, перорально.

[00187] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент вводят внутривенно или подкожно один или два раза в день в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 10 до приблизительно 350 мг или от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг. Конкретное количество второго активного агента будет зависеть от конкретного используемого агента, типа заболевания, которое подлежит лечению и/или контролю, тяжести и стадии заболевания, а также количества Соединения D и любых необязательных дополнительных активных агентов, одновременно вводимых пациенту.

[00188] Один или несколько вторых активных ингредиентов или агентов можно использовать вместе с Соединением D в способах и композициях, раскрытых в настоящем документе. Вторыми активными агентами могут быть большие молекулы (например, белки) или малые молекулы (например, синтетические неорганические, металлоорганические или органические молекулы).

[00189] Примеры активных агентов с большими молекулами включают без ограничения гемопоэтические факторы роста, цитокины и моноклональные и поликлональные антитела, в частности, терапевтические антитела к раковым антигенам. Иллюстративными активными агентами с большими молекулами являются биологические молекулы, такие как встречающиеся в природе, синтетические или рекомбинантные белки. Белки, которые особенно полезны в раскрытых в настоящем документе способах и композициях, включают белки, которые стимулируют выживание и/или пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников и иммунологически активных клеток-предшественников *in vitro* или *in vivo*. Другие полезные белки стимулируют деление и дифференцировку коммитированных эритроидных предшественников в клетках *in vitro* или *in vivo*. Конкретные белки включают без ограничения: интерлейкины, такие как IL-2 (включая рекомбинантный IL-2 («rIL2») и IL-2 оспы канареек), IL-10, IL-12 и IL-18, интерфероны, такие как интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерферон альфа-n1, интерферон альфа-n3, интерферон бета-1a и интерферон гамма-1b, GM-CSF и GM-CSF и EPO.

[00190] Согласно определенным вариантам осуществления GM-CSF, G-CSF, SCF или EPO вводят подкожно в течение приблизительно пяти дней в ходе четырех- или шестинедельного цикла в количестве в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 750 мг/м²/день, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг/м²/день, от приблизительно 50 до приблизительно 250 мг/м²/день или от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг/м²/день.

Согласно определенным вариантам осуществления GM-CSF можно вводить в количестве от приблизительно 60 до приблизительно 500 мкг/м² внутривенно в течение 2 часов или от приблизительно 5 до приблизительно 12 мкг/м²/день подкожно. Согласно определенным вариантам осуществления G-CSF можно вводить подкожно в количестве приблизительно 1 мкг/кг/день изначально и можно регулировать в зависимости от повышения общего количества гранулоцитов. Поддерживающая доза G-CSF может быть введена в количестве приблизительно 300 (у небольших пациентов) или 480 мкг подкожно. Согласно определенным вариантам осуществления EPO можно вводить подкожно в количестве 10000 ЕД 3 раза в неделю.

[00191] Конкретные белки, которые можно использовать в способах и композициях, включают без ограничения филграстим, который продается в США под торговым наименованием Neupogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA), сарграмостим, который продается в США под торговым наименованием Leukine® (Immunex, Seattle, WA), и рекомбинантный EPO, который продается в США под торговым наименованием Epogen® (Amgen, Thousand Oaks, CA).

[00192] Рекомбинантные и мутантные формы GM-CSF могут быть получены, как описано в патентах США № 5391485, 5393870 и 5229496, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Рекомбинантные и мутантные формы G-CSF могут быть получены, как описано в патентах США № 4810643, 4999291, 5528823 и 5580755, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00193] Настоящее изобретение также относится к применению в комбинации с Соединением D, включая состав Соединения D, нативных, встречающихся в природе и рекомбинантных белков. Кроме того, охватываются мутанты и производные (например, модифицированные формы) встречающихся в природе белков, которые проявляют *in vivo* по меньшей мере некоторую фармакологическую активность белков, на которых они основаны. Примеры мутантов включают без ограничения белки, которые имеют один или несколько аминокислотных остатков, отличающихся от соответствующих остатков во встречающихся в природе формах белков. Термин «мутанты» также охватывает белки, в которых отсутствуют углеводные фрагменты, обычно присутствующие в их встречающихся в природе формах (например, негликозилированные формы). Примеры производных включают без ограничения пегилированные производные и слитые белки, такие как белки, образованные путем слияния IgG1 или IgG3 с представляющим интерес белком или активной частью представляющего

интерес белка. См., например, Penichet, M.L. and Morrison, S.L., *J. Immunol. Methods* 248:91-101 (2001).

[00194] Антитела, которые можно использовать в комбинации с Соединением D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, включают моноклональные и поликлональные антитела. Примеры антител включают без ограничения трастузумаб (Herceptin®), ритуксимаб (Rituxan®), бевацизумаб (Avastin™), пертузумаб (Omnitarg™), тозитумомаб (Bexxar®), эдреколомаб (Panorex®) и G250. Состав Соединения D также можно комбинировать или использовать в комбинации с анти-TNF- α антителами и/или анти-EGFR антителами, такими как, например, Erbitux® или панитумумаб.

[00195] Активные агенты с большими молекулами можно вводить в форме противораковых вакцин. Например, вакцины, которые секретируют или вызывают секрецию цитокинов, таких как IL-2, G-CSF и GM-CSF, могут быть использованы в заявленных способах и фармацевтических композициях. См., например, Emens, L.A., *et al.*, *Curr. Opinion Mol. Ther.* 3(1):77-84 (2001).

[00196] Вторые активные агенты, которые представляют собой малые молекулы, также можно использовать для облегчения побочных эффектов, связанных с введением состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе. Однако, как и некоторые большие молекулы, многие из них, как полагают, способны обеспечивать синергетический эффект при введении (например, до, после или одновременно) с Соединением D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе. Примеры вторых активных агентов с малыми молекулами включают без ограничения противораковые агенты, антибиотики, иммунодепрессанты и стероиды.

[00197] Согласно определенным вариантам осуществления второй агент представляет собой ингибитор HSP, протеасомный ингибитор, ингибитор FLT3 или ингибитор mTOR. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибитор киназы mTOR.

[00198] Примеры противораковых средств, которые можно использовать в способах или композициях, описанных в настоящем документе, включают без ограничения: ацивицин, акларубицин, акодазола гидрохлорид, акронин, адозелезин, альдеслейкин, альтретамин, амбомицин, ацетат аметантрона, амсакрин, анастрозол, антрамицин, аспарагиназу, асперлин, азациитидин, азетепу, азотомицин, батимаSTAT, бензодепу, бикалутамид, бисантрена гидрохлорид, биснафида димезилат, бизелезин, блеомицина сульфат,

бреквинар натрия, бропиримин, бусульфан, кактиномицин, калустерон, карацемид, карбетимер, карбоплатин, кармустин, гидрохлорид карубицина, карцелезин, цедефингол, целекоксиб (ингибитор СОХ-2), хлорамбуцил, циролемицин, цисплатин, кладрибин, клофарабин, криснатол мезилат, циклофосфамид, Ага-С, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицина гидрохлорид, децитабин, дексормаплатин, дезагуанин, дезагуанина мезилат, диазиквон, доцетаксел, доксорубицин, доксорубицина гидрохлорид, дролоксифен, дролоксифена цитрат, дромостанолон пропионат, дуазомицин, эдатрексат, эфлорнитина гидрохлорид, эльсамитруцин, энлоплатин, энпромат, эпипропидин, эпирубицина гидрохлорид, эрбулозол, эзорубицина гидрохлорид, эстрамустин, эстрамустинфосфат натрия, этанидазол, этопозид, этопозидфосфат, этоприн, фадрозола гидрохлорид, фазарабин, фенретинид, флоксуридин, флударабин фосфат, фторурацил, флюороцитабин, фосквидон, фостриecin натрия, гемцитабин, гемцитабина гидрохлорид, гидроксимочевину, идарубицина гидрохлорид, ифосфамид, илмофозин, ипроплатин, иринотекан, иринотекана гидрохлорид, ланреотида ацетат, летрозол, ацетат лейпролида, лиарозола гидрохлорид, лометрексол натрия, ломустин, лосоксантрона гидрохлорид, масопрокол, майтансин, мехлорэтамина гидрохлорид, мегестрола ацетат, меленгестрола ацетат, мелфалан, меногарил, меркаптопурин, метотрексат, метотрексат натрия, метоприн, метуредеп, митиндомид, митокарцин, митокромин, митогиллин, митомальцин, митомицин, митоспир, митотан, митоксантрона гидрохлорид, микофеноловая кислота, нокодазол, ногаламицин, омацетаксин, ормаплатин, оксисуран, паклитаксел, пегаспаргаза, пелиомицин, пентамустин, пепломицина сульфат, перфосфамид, пипоброман, пипосульфат, пироксантрона гидрохлорид, пликамицин, пломестан, порфимер натрия, порфирамицин, преднимустин, прокарбазина гидрохлорид, пурамицин, пурамицина гидрохлорид, пиразофури, рибоприн, сафингол, сафингола гидрохлорид, семустин, симтразен, сорафениб, спарфосат натрия, спарсомицин, гидрохлорид спирогермания, спиромустин, спироплатин, стрептонигрин, стрептозоцин, сулофенур, талисомицин, текогалан натрия, таксотер, тегафур, телоксантрона гидрохлорид, темопорфин, тенипозид, тероксирон, тестолактон, тиамиприн, тиогуанин, тиотепа, тиазофури, тирапазамин, цитрат торемифена, ацетат трестолон, трицирибинфосфат, триметрексат, глюкуронат триметрексата, трипторелин, тубулозола гидрохлорид, урациловый иприт, уредеп, вапреотид, вертепорфин, винбластина сульфат, винкристина сульфат, виндезин, сульфат виндезина, винэпицина сульфат, винглицинат сульфат, винлейрозина сульфат, винорелбина тартрат, винрозидина сульфат, винзолидина сульфат, ворозол, зениплатин, зиностатин и зорубицина гидрохлорид.

[00199] Другие противораковые лекарственные средства, которые подлежат включению в описанные в настоящем документе способы, включают без ограничения: 20-эпи-1,25-дигидроксивитамин D3, 5-этинилурацил, абиратерон, акларубицин, ацилфульвен, адеципенол, адозелезин, альдеслейкин, антагонисты ALL-ТК, альтретамин, амбамустин, амидокс, амифостин, аминолевулиновую кислоту, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, ирографолид, ингибиторы ангиогенеза, антагонист D, антагонист G, антареликс, антидорсализирующий морфогенетический белок-1, антиандроген, карциному предстательной железы, антиэстроген, антинеопластон, антисмысловые олигонуклеотиды, афидиколина глицинат, модуляторы гена апоптоза, регуляторы апоптоза, апуриновую кислоту, ara-CDP-DL-PTBA, аргининдезаминазу, асулакрин, атаместан, атримустин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, производные баккатина III, баланол, батимастат, антагонисты BCR/ABL, бензохлорины, бензоилстауроспорин, производные беталактама, бета-алетин, беталамицин В, бетулиновую кислоту, ингибитор bFGF, бикалутамид, бисантрон, бисазиридинилспермин, биснафид, бистратен А, бизелезин, брефлат, бропиримин, будотитан, бутионин сульфоксимин, кальципотриол, кальфостин С, производные камптотецина, капецитабин, карбоксамид-амино-триазол, карбоксиамидотриазол, CaRest M3, CARN 700, ингибитор хрящевого происхождения, карцелезин, ингибиторы казеинкиназы (ICOS), кастаноспермин, цекропин В, цетрореликс, хлориды, хлорхиноксалинсульфонамид, цикапрост, цис-порфирина, кладрибин, аналоги кломифена, клотримазол, коллизмицин А, коллизмицин В, комбретастатин А4, аналог комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, криснатол, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемидин, Ага-С оксифосфат, цитолитический фактор, цитостатин, дакликсимаб, децитабин, дегидродидемнин В, дезлорелин, дексаметазон, дексифосфамид, дексразоксан, дексверапамил, диазиквон, дидемнин В, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацитидин, дигидротаксол, 9-, диоксамицин, дифенилспиромустин, доцетаксел, докозанол, доласетрон, доксифлуридин, доксорубицин, дролоксифен, дронабинол, дуокармицин SA, эбселен, экомустин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, элемена, эмифур, эпирубицин, эпистерид, аналог эстрамустина, агонисты эстрогена, антагонисты эстрогена, этанидазол, этопозидфосфат, экземестан, фадрозол, фазарабин, фенретинид, филграстим, финастерид, флавопиридол, флезелагин, флуастерон, флударабин, гидрохлорид фтордауноруцина, форфенимекс, форместан, фостриecin, фотемустин, гадолиний тексафирин, нитрат галлия, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы, гемцитабин, ингибиторы глутатиона, гепсульфам,

херегулин, гексаметиленбисацетамид, гиперин, ибандроновая кислота, идарубицин, идоксифен, идрамантон, илмофозин, иломастат, иматиниб (например, Gleevec®), имиквимод, иммуностимулирующие пептиды, ингибитор рецептора инсулиноподобного фактора роста-1, агонисты интерферона, интерфероны, интерлейкины, иобенгуан, йододоксорубицин, ипомеанол, 4-, иропласт, ирсогладин, изобенгазол, изогомогаликондрин В, итасетрон, джасплакинолид, кахалалид F, ламелларин-N триацетат, ланреотид, лейнамицин, ленограстим, лентинана сульфат, лептолстатин, летрозол, лейкозингибирующий фактор, лейкоцитарный альфа-интерферон, лейпролид+эстроген+прогестерон, лейпрорелин, левамизол, лиарозол, аналог линейного полиамина, липофильный дисахаридный пептид, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобоплатин, ломбрицин, лометрексол, лонидамин, лосоксантрон, локсорибин, лартотекан, лютеций тексафирин, лизофиллин, литические пептиды, майтанзин, манностатин А, маримастат, масопротексол, маспин, ингибиторы матрилизина, ингибиторы матричных металлопротеиназ, меногарил, мербарон, метрелин, метиониназу, метоклопрамид, ингибитор MIF, мифепристон, милтефозин, миримостим, митогуазон, митолактол, аналоги митомицина, митонафид, митотоксин фактора роста фибробластов-сапорин, митоксантрон, мофаротен, молграмостим, эрбитукс, хорионический гонадотропин человека, монофосфорилый липид A+ sk клеточной стенки микобактерий, мопидамол, горчичное противораковое средство, микапероксид В, экстракт клеточной стенки микобактерий, мириапорон, N-ацетилдиналин, N-замещенные бензамиды, нафарелин, нагрестип, налоксон + пентазоцин, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновая кислота, нилутамид, низамицин, модуляторы оксида азота, нитроксидный антиоксидант, нитрулин, облимерсен (Genasense®), O⁶-бензилгуанин, октреотид, окиценон, олигонуклеотиды, онапристон, ондансетрон, ондансетрон, орацин, пероральный индуктор цитокинов, ормаплатин, осатерон, оксалиплатин, оксауномицин, паклитаксел, аналоги паклитаксела, производные паклитаксела, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновая кислота, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин, пегаспаргаза, пельдезин, пентосан полисульфат натрия, пентостатин, пентрозол, перфлуброн, перфосфамид, периллиловый спирт, феназиномицин, фенилацетат, ингибиторы фосфатазы, пицибанил, пилокарпина гидрохлорид, пирарубицин, пиритрексим, плацетин А, плацетин В, ингибитор активатора плазминогена, комплекс платины, соединения платины, платино-триаминовый комплекс, порфимер натрия, порфирамицин, преднизолон, пропилбис-акридон, простагландин J2, ингибиторы протеасом, иммуномодулятор на основе белка А, ингибитор протеинкиназы С, ингибиторы

протеинкиназы C, микроводоросли, ингибиторы протеинтирозинфосфатазы, ингибиторы пуриннуклеозидфосфорилазы, пурпурины, пиразолоакридин, конъюгат полиоксиэтилена пиридоксильированного гемоглобина, антагонисты *raf*, ралтитрексед, рамосетрон, ингибиторы *ras*-фарнезилпротеинтрансферазы, ингибиторы *ras*, ингибитор *ras*-GAP, ретеллиптин деметилированный, этидронат рения Re 186, ризоксин, рибозимы, ретинамид RII, рохитукин, ромертид, рокинимекс, рубигинон B1, рубоксил, сафингол, сентопин, SarCNU, саркофитол A, сарграммостим, миметики Sdi 1, семустин, ингибитор старения 1, смысловые олигонуклеотиды, ингибиторы сигнальной трансдукции, сизофиран, собузоксан, борокаптат натрия, фенилацетат натрия, солверол, белок, связывающий соматомедин, сонермин, спарфозиновая кислота, спамицин D, спиромустин, спленентин, спонгистатин 1, скваламин, стипиамид, ингибиторы стромелизина, сульфинозин, суперактивный антагонист вазоактивных кишечинальных пептидов, сурадиста, сурамин, свайнсонин, таллимустин, тамоксифен метиодид, тавромустин, тазаротен, текогалан натрия, тегафур, теллурапирилий, ингибиторы теломеразы, темопорфин, тенипозид, тетрахлордекаоксид, тетразомин, талибластин, тиокоралин, тромбopoэтин, миметик тромбopoэтина, тималфазин, агонист рецептора тимопоэтина, тимотринан, тиреотропный гормон, оловоэтилэтиопурпурин, тирапазамин, бихлорид титаноцена, топсентин, торемифен, ингибиторы трансляции, третиноин, триацетилауридин, трицирибин, триметрексад, трипторелин, трописетрон, туростерид, ингибиторы тирозинкиназы, тирфостины, ингибиторы UBC, убенимекс, фактор ингибирования роста урогенитального синуса, антагонисты урокиназного рецептора, вапреотид, вариолин B, веларезол, верамин, вердены, вертепорфин, винорелбин, винксалтин, витамин, ворозол, занотерон, зениплатин, зиласкорб и зиностатин стимуламер.

[00200] Согласно определенным вариантам осуществления второй агент выбран из одного или нескольких ингибиторов контрольных точек. Согласно одному варианту осуществления один ингибитор контрольной точки применяют в комбинации с Соединение D или составом Соединения D в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления два ингибитора контрольных точек применяют в комбинации с Соединение D или составом Соединения D в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления три или более ингибитора контрольной применяют в комбинации с Соединение D или составом Соединения D в способах, раскрытых в настоящем документе.

[00201] В контексте настоящего изобретения термин «ингибитор контрольной точки иммунного ответа» или «ингибитор контрольной точки» относится к молекулам, которые полностью или частично сокращают, ингибируют, вмешиваются в или модулируют один или несколько белков контрольных точек. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86, и PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 (Pardoll, *Nature Reviews Cancer*, **2012**, *12*, 252-264). Эти белки, по-видимому, ответственны за костимулирующие или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных ответов. Белки иммунных контрольных точек, по-видимому, регулируют и поддерживают самотолерантность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или происходят из антител.

[00202] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор CTLA-4. Согласно одному варианту осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой анти-CTLA-4 антитело. Примеры анти-CTLA-4 антител включают без ограничения антитела, описанные в патентах США №№: 5811097, 5811097, 5855887, 6051227, 6207157, 6682736, 6984720 и 7605238, которые включены в настоящий документ во всей своей полноте. Согласно одному варианту осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой тремелиумаб (также известный как тицилиумаб или CP-675,206). Согласно другому варианту осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилиумаб (также известный как MDX-010 или MDX-101). Ипилиумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG, которое связывается с CTLA-4. Ипилиумаб продается под торговым наименованием Yervoy™.

[00203] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1. Примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают без ограничения ингибиторы, описанные в патентах США № 7488802, 7943743, 8008449, 8168757, 8217149 и публикациях патентных заявок РСТ №№ WO2003042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 и WO2011161699, которые включены в настоящий документ во всей своей полноте.

[00204] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-PD-

1 антитело представляет собой BGB-A317, ниволумаб (также известный как ONO-4538, BMS-936558 или MDX1106) или пембролизумаб (также известный как MK-3475, SCH 900475 или ламбролизумаб). Согласно одному варианту осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой человеческое IgG4 анти-PD-1 моноклональное антитело и продается под торговым наименованием Opdivo™. Согласно другому варианту осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное IgG4 антитело и продается под торговым наименованием Keytruda™. Согласно другому варианту осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой гуманизированное антитело CT-011. CT-011, введенное отдельно, не показало ответа при лечении острого миелолейкоза (AML) при рецидиве. Согласно другому варианту осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой слитый белок AMP-224. Согласно другому варианту осуществления PD-1 антитело представляет собой BGB-A317. BGB-A317 представляет собой моноклональное антитело, в котором специально сконструирована способность связывать гамма-рецептор I Fc, и которое обладает уникальной сигнатурой связывания с PD-1 с высокой аффинностью и превосходной специфичностью к мишени.

[00205] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. Согласно одному варианту осуществления PD-L1 ингибитор представляет собой анти-PD-L1 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб). Согласно другому варианту осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой BMS-936559 (также известный как MDX-1105-01). Согласно другому варианту осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб (также известный как MPDL3280A и Tecentriq®).

[00206] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L2. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой анти-PD-L2 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-PD-L2 антитело представляет собой rHlgM12B7A.

[00207] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3). Согласно одному варианту осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой IMP321, растворимый слитый белок Ig (Brignone *et al.*, *J. Immunol.*, **2007**, 179, 4202-4211). Согласно другому варианту осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой BMS-986016.

[00208] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор B7. Согласно одному варианту осуществления ингибитор B7 представляет собой ингибитор B7-H3 или ингибитор B7-H4. Согласно одному варианту осуществления ингибитор B7-H3 представляет собой MGA271, анти-B7-H3 антитело (Loo *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2012**, 3834).

[00209] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен 3) (Fourcade *et al.*, *J. Exp. Med.*, **2010**, 207, 2175-86, Sakuishi *et al.*, *J. Exp. Med.*, **2010**, 207, 2187-94).

[00210] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой агонист OX40 (CD134). Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-OX40 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-OX40 антитело представляет собой анти-OX-40. Согласно другому варианту осуществления анти-OX40 антитело представляет собой MEDI6469.

[00211] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой агонист GITR. Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-GITR антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-GITR антитело представляет собой TRX518.

[00212] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой агонист CD137. Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CD137 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб. Согласно другому варианту осуществления анти-CD137 антитело представляет собой PF-05082566.

[00213] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой агонист CD40. Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CD40 антитело. Согласно одному варианту осуществления анти-CD40 антитело представляет собой CF-870,893.

[00214] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой рекомбинантный человеческий интерлейкин-15 (rhIL-15).

[00215] Согласно одному варианту осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор IDO. Согласно одному варианту осуществления ингибитор IDO

представляет собой INCB024360. Согласно другому варианту осуществления ингибитор IDO представляет собой индоксимод.

[00216] Согласно определенным вариантам осуществления комбинированная терапия, раскрытая в настоящем документе, включает два или более ингибитора контрольных точек, описанных в настоящем документе (включая ингибиторы контрольных точек одного и того же или другого класса). Кроме того, комбинированные терапии, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в комбинации со вторыми активными агентами, как описано в настоящем документе, когда это целесообразно, для лечения заболеваний, описанных в настоящем документе и известных специалистам в данной области техники.

[00217] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D можно использовать в комбинации с одной или несколькими иммунными клетками, экспрессирующими один или несколько химерных антигенных рецепторов (CAR) на своей поверхности (например, модифицированная иммунная клетка). Как правило, CAR содержат внеклеточный домен из первого белка, например, антигенсвязывающего белка, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Согласно определенным вариантам осуществления, как только внеклеточный домен связывается с белком-мишенью, таким как опухолассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифический антиген (TSA), через внутриклеточный сигнальный домен генерируется сигнал, который активирует иммунную клетку, например, для нацеливания на и уничтожения клетки, экспрессирующей целевой белок.

[00218] Внеклеточные домены: внеклеточные домены CAR связываются с представляющим интерес антигеном. Согласно определенным вариантам осуществления внеклеточный домен CAR содержит рецептор или часть рецептора, который связывается с указанным антигеном. Согласно определенным вариантам осуществления внеклеточный домен содержит или представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть. Согласно конкретным вариантам осуществления внеклеточный домен содержит или представляет собой одноцепочечный домен Fv (scFv). Одноцепочечный домен Fv может содержать, например, VL, связанный с VH гибким линкером, где указанные VL и VH происходят из антитела, которое связывает указанный антиген.

[00219] Согласно определенным вариантам осуществления антиген, распознаваемый внеклеточным доменом полипептида, описанного в настоящем документе, представляет собой опухолассоциированный антиген (ТАА) или опухолеспецифический

антиген (OCA). Согласно различным конкретным вариантам осуществления опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой без ограничения Her2, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), альфа-фетопротеин (AFP), раково-эмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретинин, MUC-1, антиген созревания В-клеток (BCMA), белок эпителиальной мембраны (EMA), антиген эпителиальной опухоли (ETA), тирозиназу, антиген, ассоциированный с меланомой-24 (MAGE), CD19, CD22, CD27, CD30, CD34, CD45, CD70, CD99, CD117, EGFRvIII (эпидермальный фактор роста, вариант III), мезотелин, PAP (простатическая кислая фосфатаза), простеин, TARP (белок с альтернативной рамкой считывания гамма-рецептора Т-клеток), Trp-p8, STEAPI (шеститрансmemбранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок макроскопической кистозной жидкости (GCDFP-15), антиген HMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами, MART-I), мио-D1, мышечно-специфический актин (MSA), нейрофиламент, нейрон-специфическую энолазу (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофиз, тиреоглобулин, фактор транскрипции щитовидной железы-1, димерную форму изофермента пируваткиназы типа M2 (опухолевой M2-PK), аномальный белок gas или аномальный белок p53. Согласно другим вариантам осуществления TAA или TCA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой интегрин $\alpha v \beta 3$ (CD61), галактин или Ral-B.

[00220] Согласно определенным вариантам осуществления TAA или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой антиген рака/яичек (CT), например, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ES0-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXBI, SPA17, SSX, SYCP1 или TPTE.

[00221] Согласно другим определенным вариантам осуществления TAA или TCA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой углевод или ганглиозид, например, fuc-GMI, GM2 (онкофетальный антиген-иммуногенный-1, OFA-I-1), GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 и тому подобное.

[00222] Согласно другим определенным вариантам осуществления TAA или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой альфа-актинин-4, Bage-1, BCR-ABL, слитый белок Bcr-Abl, бета-катенин, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, слитый белок dek-can, EBNA, EF2, антигены вируса Эпштейна-Барр, слитый белок ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2,

KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2 и 3, нео-PAP, миозин класса I, OS-9, слитый белок pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, триозофосфатизомераза, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NДаo1/Lage-2, SP17, SSX2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel17), тирозиназу, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, HRas, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, 13-катенин, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, теломеразу, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, C0-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-C0-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP или TPS.

[00223] Согласно различным конкретным вариантам осуществления опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой опухолевый антиген, связанный с AML, как описано в S. Anguille et al, Лейкоз (2012), 26, 2186-2196.

[00224] Специалистам в данной области техники известны другие опухолеассоциированные и опухолеспецифические антигены.

[00225] Рецепторы, антитела и scFv, которые связываются с TSA и TAA, пригодные для конструирования химерных антигенных рецепторов, известны в данной области техники, как и нуклеотидные последовательности, которые их кодируют.

[00226] Согласно определенным конкретным вариантам осуществления антиген, распознаваемый внеклеточным доменом химерного антигенного рецептора, представляет собой антиген, в общем не рассматриваемый как TSA или TAA, но, тем не менее, связанный с опухолевыми клетками или повреждением, вызванным опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления, например, антиген представляет собой, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, ассоциированный с ангиогенезом или васкулогенезом. Такие факторы роста, цитокины или интерлейкины могут включать, например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) или интерлейкин-8 (IL-8). Опухоли также могут создавать гипоксическую среду локально по отношению к опухоли. Таким образом, согласно другим конкретным вариантам осуществления антиген представляет собой фактор, ассоциированный с гипоксией, например, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α или

HIF-3 β . Опухоли также могут вызывать локальное повреждение нормальной ткани, вызывая высвобождение молекул, известных как молекулы молекулярного паттерна, связанные с повреждением (DAMP, также известные как алармины). Таким образом, согласно некоторым другим конкретным вариантам осуществления антиген представляет собой DAMP, например, белок теплового шока, хроматин-ассоциированный белок с высокой подвижностью, блок 1 (HMGB 1), S100A8 (MRP8, кальгранулин A), S100A9 (MRP14, кальгранулин B), сывороточный амилоид A (SAA) или может представлять собой дезоксирибонуклеиновую кислоту, аденозинтрифосфат, мочевую кислоту или гепаринсульфат.

[00227] Трансмембранный домен: Согласно определенным вариантам осуществления внеклеточный домен CAR присоединен к трансмембранному домену полипептида с помощью линкерной, спейсерной или шарнирной полипептидной последовательности, например, последовательности из CD28 или последовательности из CTLA4. Трансмембранный домен может быть получен или происходит из трансмембранного домена любого трансмембранного белка и может включать весь или часть такого трансмембранного домена. Согласно конкретным вариантам осуществления трансмембранный домен может быть получен или происходит из, например, CD8, CD16, рецептора цитокинов и рецептора интерлейкина или рецептора фактора роста и т.п.

[00228] Внутриклеточные сигнальные домены: Согласно определенным вариантам осуществления внутриклеточный домен CAR представляет собой или содержит внутриклеточный домен или мотив белка, который экспрессируется на поверхности Т-клеток и запускает активацию и/или пролиферацию указанных Т-клеток. Такой домен или мотив способен передавать первичный антигенсвязывающий сигнал, необходимый для активации Т-лимфоцита в ответ на связывание антигена с внеклеточной частью CAR. Как правило, этот домен или мотив содержит или представляет собой ITAM (мотив активации иммунорецептора на основе тирозина). Полипептиды, содержащие ITAM, подходящие для CAR, включают, например, дзета-цепь CD3 (CD3 ζ) или ее части, содержащие ITAM. Согласно конкретному варианту осуществления внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ . Согласно другим конкретным вариантам осуществления внутриклеточный домен происходит из цепи рецептора лимфоцитов, сложного белка TCR/CD3, субъединицы рецептора Fe или субъединицы рецептора IL-2. Согласно определенным вариантам осуществления CAR дополнительно содержит один или несколько костимулирующих доменов или мотивов, например, как часть внутриклеточного домена

полипептида. Один или более костимулирующих доменов или мотивов могут представлять собой или могут содержать одну или более из костимулирующей полипептидной последовательности CD27, костимулирующей полипептидной последовательности CD28, костимулирующей полипептидной последовательности OX40 (CD134), костимулирующей полипептидной последовательности OX40 (CD134), костимулирующей полипептидной последовательности 4-1BB (CD137) или костимулирующей полипептидной последовательности Т-клеточного костимулятора (ICOS), или другого костимулирующего домена или мотива, или любой их комбинации.

[00229] CAR также может содержать мотив выживания Т-клеток. Мотив выживания Т-клеток может представлять собой любую полипептидную последовательность или мотив, который способствует выживанию Т-лимфоцитов после стимуляции антигеном. Согласно определенным вариантам осуществления мотив выживания Т-клеток представляет собой или происходит из CD3, CD28, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-7 (IL-7R), внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-12, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-15, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-21 или внутриклеточного сигнального домена рецептора трансформирующего фактора роста β (TGF β).

[00230] Модифицированные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, могут представлять собой, например, Т-лимфоциты (Т-клетки, например, Т-клетки CD4⁺ или Т-клетки CD8⁺), цитотоксические лимфоциты (CTL) или клетки-естественные киллеры (NK). Т-лимфоциты, используемые в композициях и способах, раскрытых в настоящем документе, могут быть наивными Т-лимфоцитами или МНС-рестриктированными Т-лимфоцитами. Согласно определенным вариантам осуществления Т-лимфоциты представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL). Согласно определенным вариантам осуществления Т-лимфоциты были выделены из биопсии опухоли или были размножены из Т-лимфоцитов, выделенных из биопсии опухоли. Согласно другим определенным вариантам осуществления Т-клетки были выделены или размножены из Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, пуповинной крови или лимфы. Иммунные клетки, используемые для получения модифицированных иммунных клеток, экспрессирующих CAR, могут быть выделены с использованием принятых в данной области техники рутинных способов, например, сбора крови с последующим аферезом и, необязательно, выделения или сортировки клеток с помощью антител.

[00231] Модифицированные иммунные клетки являются аутологичными для индивидуума, которому должны быть введены модифицированные иммунные клетки. Согласно другим определенным вариантам осуществления модифицированные иммунные клетки являются аллогенными для индивидуума, которому должны быть введены модифицированные иммунные клетки. Когда для получения модифицированных Т-лимфоцитов используются аллогенные Т-лимфоциты или NK-клетки, предпочтительно выбирать Т-лимфоциты или NK-клетки, которые снижают вероятность реакции трансплантат против хозяина (GVHD) у индивидуума. Например, согласно определенным вариантам осуществления для получения модифицированных Т-лимфоцитов отбирают вирусспецифические Т-лимфоциты, такие лимфоциты, как ожидают, будут иметь значительно сниженную нативную способность связываться с любыми реципиентными антигенами и, таким образом, активироваться ими. Согласно определенным вариантам осуществления опосредованное реципиентом отторжение аллогенных Т-лимфоцитов можно уменьшить путем совместного введения хозяину одного или нескольких иммунодепрессантов, например, циклоспорина, такролимуса, сиролимуса, циклофосфамида или т.п.

[00232] Т-лимфоциты, например, немодифицированные Т-лимфоциты или Т-лимфоциты, экспрессирующие CD3 и CD28, или содержащие полипептид, содержащий сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28, могут быть размножены с использованием антител к CD3 и CD28, например, антител, прикрепленных к шарикам, см., например, патенты США № 5948893, 6534055, 6352694, 6692964, 6887466 и 6905681.

[00233] Модифицированные иммунные клетки, например, модифицированные Т-лимфоциты, могут необязательно содержать «ген суицида» или «защитный переключатель», который позволяет при желании уничтожить практически все модифицированные иммунные клетки. Например, модифицированные Т-лимфоциты согласно определенным вариантам осуществления могут содержать ген тимидинкиназы HSV (HSV-TK), который вызывает гибель модифицированных Т-лимфоцитов при контакте с ганцикловиром. Согласно другому варианту осуществления модифицированные Т-лимфоциты содержат индуцируемую каспазу, например, индуцируемую каспазу 9 (икаспазу 9), например, слитый белок между каспазой 9 и белком, связывающим FK506 человека, что позволяет проводить димеризацию с использованием специфического низкомолекулярного фармацевтического препарата. См. Straathof *et al.*, *Blood* 105(11):4247-4254 (2005).

[00234] Конкретные вторые активные агенты, применимые в способах или композициях, включают без ограничения ритуксимаб, облимерсен (Genasense®), ремикад, доцетаксел, целекоксиб, мелфалан, дексаметазон (Decadron®), стероиды, гемцитабин, цисплатин, темозоломид, этопозид, циклофосфамид, темодар, карбоплатин, прокарбазин, глиадель, тамоксифен, топотекан, метотрексат, Arisa®, таксол, таксотер, фторурацил, лейковорин, иринотекан, кселоду, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа (например, PEG INTRON-A), капецитабин, цисплатин, тиотепу, флударабин, карбоплатин, липосомальный даунорубицин, Ara-C, доксетаксол, пачитаксел, винбластин, IL-2, GM-CSF, дакарбазин, винорелбин, золедроновую кислоту, пальмитронат, биаксин, бусульфан, преднизон, бисфосфонат, триоксид мышьяка, винкристин, доксорубицин (Doxil®), паклитаксел, ганцикловир, адриамицин, эстрамустин натрия фосфат (Emcyt®), сулиндак и этопозид.

[00235] Согласно определенным вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение второго активного агента в комбинации с Соединением D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, может быть модифицировано или отложено во время или вскоре после введения Соединения D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, как сочтет целесообразным специалист-практик в данной области техники. Согласно определенным вариантам осуществления субъекты, которым вводят Соединение D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, отдельно или в комбинации с другими видами терапии, могут получать поддерживающую терапию, включая противорвотные средства, миелоидные факторы роста и трансфузии тромбоцитов, когда это уместно. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам, которым вводят Соединение D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, можно вводить фактор роста в качестве второго активного агента в соответствии с решением специалиста в данной области техники. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к введению Соединения D, включая состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, в комбинации с эритропоэтином или дарбепоэтином (Aranesp).

[00236] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики, контроля и/или облегчения местно-распространенного или метастатического рака мочевого пузыря с переходными клетками, предусматривающему введение состава Соединения D с гемцитабином, цисплатином, 5-фторурацилом,

митомицином, метотрексатом, винбластином, доксорубицином, карбоплатином, тиотепой, паклитакселом, доцетакселом, атезолизумабом, авелумабом, дурвалумабом, Keytruda (пембролизумабом) и/или ниволумабом.

[00237] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения рака, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D в комбинации со вторым активным агентом следующим образом: темозоломид пациентам детского возраста с рецидивирующими или прогрессирующими опухолями головного мозга или рецидивирующей нейробластомой, целекоксиб, этопозид и циклофосфамид при рецидивирующем или прогрессирующем раке ЦНС, темодар пациентам с рецидивирующей или прогрессирующей менингиомой, злокачественной менингиомой, гемангиоперицитомой, множественными метастазами в головной мозг, рецидивом опухоли головного мозга или впервые диагностированной мультиформной глиобластомой, иринотекан пациентам с рецидивирующей глиобластомой, карбоплатин детям с глиомой ствола головного мозга, прокарбазин педиатрическим пациентам с прогрессирующими злокачественными глиомами, циклофосфамид пациенты с неблагоприятным прогнозом злокачественной опухоли головного мозга, впервые диагностированными или рецидивирующими мультиформами глиобластомы, Gliadel® при рецидивирующих злокачественных глиомах высокой степени злокачественности, темозоломид и тамоксифен при анапластической астроцитоме, или топотекан для глиом, глиобластомы, анапластической астроцитомы или анапластической олигодендроглиомы.

[00238] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения метастатического рака молочной железы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с метотрексатом, циклофосфамидом, капецитабином, 5-фторурацилом, таксаном, темсиролимузом, ABRAXANE® (частицы паклитаксела, связанные с белком, для суспензии для инъекций) (связанные с альбумином), лапатинибом, герцептином, динатрия памидронатом, эрибулина мезилатом, эверолимузом, гемцитабином, палбоциклибом, иксабепилоном, кадсила, пертузумабом, теотепа, анастрозолом, доцетакселом, доксорубицина гидрохлоридом, эпирубицина гидрохлоридом, торемифеном, фулвестрантом, гозерелин ацетатом, рибоциклибом, мегестрола ацетатом, винбластином, ингибиторами ароматазы, такими как летрозол, экземестан, селективными модуляторами эстрогена, антагонистами рецепторов эстрогена, антрациклинами, эмтанзином и/или пексидартинибом, пациентам с метастатическим раком молочной железы.

[00239] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения нейроэндокринных опухолей, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с по меньшей мере одним из эверолимуса, авелумаба, сунитиниба, нексавара, лейковорина, оксалиплатина, темозоломида, капецитабина, бевацизумаба, доксорубицина (адриамицина), фторурацила (адруцил, 5-фторурацил), стрептозоцина (Zanosar), дакарбазина, сандостатина, ланреотида и/или пасиреотида, пациентам с нейроэндокринными опухолями.

[00240] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения метастатического рака молочной железы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с метотрексатом, гемцитабином, цисплатином, цетуксимабом, 5-фторурацилом, блеомицином, доцетакселом, карбоплатином, гидроксимочевиной, пембролизумабом и/или ниволумабом, пациентам с рецидивирующим или метастатическим раком головы или шеи.

[00241] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения рака поджелудочной железы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с гемцитабином, ABRAXANE®, 5-фторурацилом, афинитором, иринотеканом, митомицином C, сунитинибом, сунитинибмалатом и/или тарцева, пациентам с раком поджелудочной железы.

[00242] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения рака толстой или прямой кишки, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с ARISA®, авастатином, оксалиплатином, 5-фторурацилом, иринотеканом, капецитабином, цетуксимабом, рамуцирумабом, панитумумабом, бевацизумабом, лейковорином кальция, лонсурфом, регорафенибом, ziv-афлиберцептом, таксолом и/или таксотером.

[00243] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения невосприимчивого колоректального рака, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с капецитабином и/или вемурафенибом, пациентам с рефрактерным колоректальным раком или пациентам, у которых терапия первой линии неэффективна или показала плохую эффективность при аденокарциноме толстой или прямой кишки.

[00244] Согласно одному аспекту способы лечения, профилактики, контроля и/или облегчения колоректального рака, раскрытые в настоящем документе, предусматривают

введение состава Соединения D с фторурацилом, лейковорином и/или иринотеканом, пациентам с колоректальным раком, включая стадию 3 и стадию 4, или пациентам, которые ранее получали лечение при метастатическом колоректальном раке.

[00245] Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с невосприимчивым колоректальным раком в комбинации с капецитабином, кселодой и/или иринотеканом.

[00246] Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят с капецитабином и иринотеканом пациентам с невосприимчивым колоректальным раком или пациентам с нерезектабельной или метастатической колоректальной карциномой.

[00247] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с интерфероном альфа или капецитабином пациентам с нерезектабельной или метастатической гепатоцеллюлярной карциномой, или с цисплатином и тиотепой или с тозилатом сорафениба, пациентам с первичным или метастатическим раком печени.

[00248] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с доксорубицином, паклитакселом, винбластином, пегилированным интерфероном альфа и/или рекомбинантным интерфероном альфа-2b, пациентам с саркомой Капоши.

[00249] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с по меньшей мере одним из эназидениба, триоксида мышьяка, флударабина, карбоплатина, даунорубицина, циклофосфамида, цитарабина, доксорубицина, идарубицина, гидрохлорида митоксантрона, тиогуанина, винкристина, мидостаурина и/или топотекана, пациентам с острым миелолейкозом, включая невосприимчивый или рецидивирующий миелолейкоз или острый миелолейкоз высокого риска.

[00250] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с по меньшей мере одним из эназидениба, липосомального даунорубицина, топотекана и/или цитарабина, пациентам с неблагоприятным кариотипом острого миелобластного лейкоза.

[00251] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с ингибитором IDH2 пациенту, страдающему

лейкозом, при этом лейкоз характеризуется наличием мутантного аллеля IDH2. Примеры ингибиторов IDH2 раскрыты в патентах США № 9732062, 9724350, 9738625 и 9579324 и публикациях США № 2016-0159771 и США 2016-0158230 A1. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с энзимиденибом пациенту, страдающему лейкозом, при этом лейкоз характеризуется наличием мутантного аллеля IDH2. Согласно определенным вариантам осуществления комбинация Соединения D и ингибитора IDH2 увеличивает количество дифференцированных клеток (CD34-/CD38) и эритробластов у пациента, страдающего острым миелолейкозом, при этом острый миелолейкоз характеризуется присутствием IDH2 R140Q. Согласно определенным вариантам осуществления комбинация Соединения D и ингибитора IDH2 снижает клетки-предшественники (CD34+/CD38+) и HSC у пациента, страдающего острым миелолейкозом, при этом острый миелолейкоз характеризуется присутствием IDH2 R140Q.

[00252] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с энзимиденибом пациенту с острым миелолейкозом, при этом острый миелолейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному варианту осуществления мутантный аллель IDH2 представляет собой IDH2 R140Q или R172K.

[00253] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с энзимиденибом пациенту, страдающему лейкозом, при этом лейкоз характеризуется наличием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с энзимиденибом, пациенту, страдающему острым миелолейкозом, при этом острый миелолейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному варианту осуществления мутантный аллель IDH2 представляет собой IDH2 R140Q или R172K.

[00254] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с 6-(6-(трифторметил)пиридин-2-ил)-N2-(2-(трифторметил)пиридин-4-ил)-1,3,5-триазин-2,4-диамином (Соединение 2) пациенту с лейкозом, при этом лейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с Соединением 2 пациенту с острым миелолейкозом, при этом острый

миелолейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному варианту осуществления мутантный аллель IDH2 представляет собой IDH2 R140Q или R172K.

[00255] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с Соединением 2 пациенту с лейкозом, при этом лейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D с Соединением 2 пациенту с острым миелолейкозом, при этом острый миелолейкоз характеризуется присутствием мутантного аллеля IDH2. Согласно одному варианту осуществления мутантный аллель IDH2 представляет собой IDH2 R140Q или R172K.

[00256] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с метотрексатом, гидрохлоридом мехлорэтамину, дималеатом афатиниба, пеметрекседом, бевацизумабом, карбоплатином, цисплатином, церитинибом, кризотинибом, рамуцирумабом, пембролизумабом, доцетакселом, тартратом винорелбина, гемцитабином, ABRAXANE®, эрлотинибом, гефтинибом, иринотеканом, эверолимусом, алектинибом, бригатинибом, ниволумабом, осимертинибом, атезолизумабом, нецитумумабом, пациентам с немелкоклеточным раком легкого.

[00257] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с карбоплатином и иринотеканом пациентам с немелкоклеточным раком легкого.

[00258] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с доцетаксолом пациентам с немелкоклеточным раком легкого, которые ранее получали лечение карбо/этопозидом и лучевой терапией.

[00259] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с карбоплатином и/или таксотером или в комбинации с карбоплатином, палипитаксолом и/или торакальной лучевой терапией, пациентам с немелкоклеточным раком легкого.

[00260] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с таксотером, пациентам с немелкоклеточным раком легкого стадии IIIB или IV.

[00261] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с облимерсеном (Genasense®),

метотрексатом, гидрохлоридом мехлорэтамина, этопозидом, топотеканом и/или доксорубицином, пациентам с мелкоклеточным раком легкого.

[00262] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с Венетоклаксом, АВТ-737 (Abbott Laboratories) и/или обатоклаксом (GX15-070) пациентам с лимфомой или другим раком крови.

[00263] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D со вторым активным ингредиентом, таким как винбластин или флударабин, адцетрис, амбохлорин, бецен, блеомицин, брентуксимаб ведотин, кармустином хлорамбуцил, циклофосфамид, дакарбазин, доксорубицин, ломустин, матулан, мехлорэтамина гидрохлорид, преднизолон, прокарбазин гидрохлорид, винкристин, метотрексат, неларабин, белиностан, бендамустин HCl, тозитумомаб и йод 131 тозитумомаб, денилейкин дифтитокс, дексаметазон, пралатрексат, преликсафор, обинутузумаб, ибритумомаб, тиуксефан, ибритилиниб, лендоминаб, иделазид, интрон ритуксимаб и/или вориностан, пациентам с различными типами лимфомы, включая без ограничения лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, кожную В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому или рецидивирующую или невосприимчивую фолликулярную лимфому низкой степени злокачественности.

[00264] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с таксотером, дабрафенибом, имлиджиком, ипилимумабом, пембролизумабом, ниволумабом, траметинибом, вемурафенибом, талимогеном лагепарепвеком, IL-2, IFN, GM-CSF и/или дакарбазином, альдеслейкином, кобиметинибом, Intron A®, пегинтерфероном Альфа-2b и/или траметинибом, пациентам с различными типами или стадиями меланомы.

[00265] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с винорелбином или пеметрекседом династрия пациентам со злокачественной мезотелиомой или немелкоклеточным раком легкого стадии IIIB с плевральными имплантатами или синдромом злокачественного плеврального выпота мезотелиомы.

[00266] Согласно одному аспекту способы лечения пациентов с различными типами или стадиями множественной миеломы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D с дексаметазоном, золедроновой кислотой, пальмитронатом, GM-CSF, биаксином, винбластином, мелфаланом, бусульфаном,

циклофосфамидом, IFN, преднизолом, бисфосфонатом, целекоксибом, триоксидом мышьяка, PEG INTRON-A, винкристином, беценумом, бортезомибом, карфилзомибом, доксорубицином, панобиноостатом, леналидомидом, помалидомидом, талидомидом, мозобилом, кармустином, даратумумабом, элотузумабом, иксазомиб цитратом, плериксафором или их комбинацией.

[00267] Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с различными типами или стадиями множественной миеломы в комбинации с химерным антигенным рецептором (CAR) T-клеток. Согласно определенным вариантам осуществления CAR T-клеток в комбинации нацелен на антиген созревания B-клеток (BCMA), а согласно более конкретным вариантам осуществления CAR T-клеток представляет собой bb2121 или bb21217. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR T-клеток представляет собой JCARN125.

[00268] Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с рецидивирующей или невосприимчивой множественной миеломой в комбинации с доксорубицином (Doxil®), винкристином и/или дексаметазоном (Decadron®).

[00269] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D, при различных типах или стадиях рака яичников, таких как перитонеальная карцинома, папиллярная серозная карцинома, невосприимчивый рак яичников или рецидивирующий рак яичников, в комбинации с таксолом, карбоплатином, доксорубицином, гемцитабином, цисплатином, кселода, паклитакселом, дексаметазоном, авастинном, циклофосфамидом, топотеканом, олапарибом, тиотепа, мелфаланом, моногидрат нирапариба тозилата, рубрака или их комбинацией.

[00270] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D, при различных типах или стадиях рака предстательной железы, в комбинации с кселода, 5 FU/LV, гемцитабином, иринотеканом плюс гемцитабин, циклофосфамидом, винкристином, дексаметазоном, GM-CSF, целекоксибом, таксотером, ганцикловиром, паклитакселом, адриамицином, доцетакселом, эстрамустином, эмцитом, дендероном, зитига, бикалутамидом, кабазитакселом, дегареликсом, энзалутамидом, золадексом, лейпролида ацетатом, митоксантрона гидрохлоридом, преднизолоном, сипулеуцел-Т, радия 223 дихлоридом или их комбинацией.

[00271] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D, при различных типах или стадиях почечноклеточного рака, в комбинации с капецитабином, IFN, тамоксифеном, IL-2, GM-CSF, Celebrex®, флутамидом, гозерелина ацетатом, нилутамидом или их комбинацией.

[00272] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D, при различных типах или стадиях гинекологического рака, саркомы матки или мягких тканей в комбинации с IFN, дактиномицином, доксорубицином, иматиниба мезилатом, пазопанибом, гидрохлоридом, трабектедином, эрибулина мезилатом, оларатумабом, ингибитором COX-2, таким как целекоксиб и/или сулиндак.

[00273] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D пациентам с различными типами или стадиями солидных опухолей в комбинации с целекоксибом, этопозидом, циклофосфамидом, доцетакселом, апецитабином, IFN, тамоксифеном, IL-2, GM-CSF или их комбинацией.

[00274] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D пациентам со склеродермией или кожным васкулитом в комбинации с целебрексом, этопозидом, циклофосфамидом, доцетакселом, апецитабином, IFN, тамоксифеном, IL-2, GM-CSF или их комбинацией.

[00275] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D пациентам с MDS в комбинации с азацитидином, цитарабином, даунорубицином, децитабином, идарубицином, леналидомидом, энасиденибом или их комбинацией.

[00276] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с гематологической злокачественной опухолью в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков BH3, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение состава Соединения D пациентам с гематологической злокачественной опухолью в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3,

ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK.

[00277] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK.

[00278] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с AML в комбинации с одним или несколькими вторыми агентами, выбранными из ингибиторов JAK, ингибиторов FLT3, ингибиторов mTOR, ингибиторов сплайсингсом, ингибиторов BET, ингибиторов SMG1, ингибиторов ERK, ингибиторов LSD1, миметиков ВНЗ, ингибиторов топоизомеразы и ингибиторов RTK.

[00279] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор mTOR выбран из эверолимуса, MLN-0128 и AZD8055. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибитор киназы mTOR. Согласно

определенным вариантам осуществления ингибитор киназы mTOR выбран из 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-она (CC-223) и 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-она (CC-115). Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-оном (CC-223). Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-оном (CC-115). Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с MLN-0128. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с AZD8055.

[00280] Согласно одному аспекту способа, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с ингибитором mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор mTOR выбран из эверолимуса, MLN-0128 и AZD8055. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибитор киназы mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор киназы mTOR выбран из 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-она (CC-223) и 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-она (CC-115). Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиазин-2(1H)-оном. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления эверолимус вводят пациентам с AML до введения Соединения D. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с MLN-0128. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с AZD8055.

[00281] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с MPN в комбинации с ингибитором JAK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с MPN в комбинации с ингибитором JAK. Согласно одному аспекту ингибитор JAK выбран из ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 и ингибитора JAK3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из тофацитиниба, момелотиниба, филготиниба, децернотиниба, барцитиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из тофацитиниба, момелотиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с тофацитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с момелотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с филготинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с децернотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с барцитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с руксолитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с федратинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с NS-018. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с MPN в комбинации с пакритинибом. Согласно определенным вариантам осуществления MPN является IL-3-независимым. Согласно определенным вариантам осуществления MPN характеризуется мутацией JAK 2, например, мутацией JAK2V617F.

[00282] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с миелофиброзом в комбинации с ингибитором JAK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с ингибитором JAK. Согласно одному аспекту ингибитор JAK выбран из ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 и ингибитора JAK3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из тофацитиниба, момелотиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят

пациентам с миелофиброзом в комбинации с тофацитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с момелотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с руксолитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с федратинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с NS-018. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с миелофиброзом в комбинации с пакритинибом. Согласно определенным вариантам осуществления миелофиброз характеризуется мутацией JAK 2, например, мутацией JAK2V617F. Согласно некоторым вариантам осуществления миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз. Согласно другим вариантам осуществления миелофиброз представляет собой вторичный миелофиброз. Согласно некоторым таким вариантам осуществления вторичный миелофиброз представляет собой миелофиброз после истинной полицитемии. Согласно другим вариантам осуществления вторичный миелофиброз представляет собой миелофиброз после эссенциальной тромбоцитомии.

[00283] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором JAK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором JAK. Согласно одному аспекту ингибитор JAK выбран из ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 и ингибитора JAK3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из тофацитиниба, момелотиниба, филготиниба, децернотиниба, барцитиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из момелотиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с тофацитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с момелотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с филготинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с децернотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления

Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с барцитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с руксолитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с федратинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с NS-018. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с пакритинибом. Согласно определенным вариантам осуществления MPN характеризуется мутацией JAK 2, например, мутацией JAK2V617F.

[00284] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с ингибитором JAK. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором JAK. Согласно одному аспекту ингибитор JAK выбран из ингибитора JAK1, ингибитора JAK2 и ингибитора JAK3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из тофацитиниба, момелотиниба, филготиниба, децернотиниба, барцитиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор JAK выбран из момелотиниба, руксолитиниба, федратиниба, NS-018 и пакритиниба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с тофацитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с момелотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с филготинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с децернотинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с барцитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с руксолитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с федратинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с NS-018. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с пакритинибом. Согласно определенным вариантам осуществления MPN характеризуется мутацией JAK 2, например, мутацией JAK2V617F.

[00285] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором киназы FLT3. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором киназы FLT3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор киназы FLT3 выбран из квизартиниба, сунитиниба, сунитиниб малата, мидостаурина, пексидартиниба, лестауртиниба, тандутиниба и креноланиба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с квизартинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с сунитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с мидостаурином. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с пексидартинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с лестауртинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с тандутинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с креноланибом. Согласно определенным вариантам осуществления пациент имеет мутацию FLT3-ITD.

[00286] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с ингибитором киназы FLT3. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором киназы FLT3. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор киназы FLT3 выбран из квизартиниба, сунитиниба, сунитиниб малата, мидостаурина, пексидартиниба, лестауртиниба, тандутиниба, квизартиниба и креноланиба. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с квизартинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с сунитинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с мидостаурином. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с пексидартинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с лестауртинибом. Согласно определенным вариантам осуществления

Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с тандутинибом. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с креноланибом. Согласно определенным вариантам осуществления пациент имеет мутацию FLT3-ITD.

[00287] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором сплайсингсомы. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором сплайсингсомы. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор сплайсингсомы представляет собой пладиенолид B, 6-деоксипладиенолид D или H3B-8800.

[00288] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором киназы SMG1. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором киназы SMG1. Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с ингибитором киназы SMG1. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор SMG1 представляет собой 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-он, хлор-N,N-диэтил-5-((4-(2-(4-(3-метилуреидо)фенил)пиридин-4-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензолсульфонамид (соединение Ii), или соединение, раскрытое в A. Gopalsamy et al, Bioorg. Med Chem Lett. 2012, 22:6636-66412 (например, хлор-N,N-диэтил-5-((4-(2-(4-(3-метилуреидо)фенил)пиридин-4-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензолсульфонамид.

[00289] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором BCL2. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором BCL2. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором BCL2. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с

AML в комбинации с ингибитором BCL2, например, венетоклакс или навитоклакс. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BCL2 представляет собой венетоклакс.

[00290] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML, который устойчив к лечению ингибитором BCL2, предусматривающему введение Соединения D. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML, который приобрел устойчивость к лечению венетоклаксом, предусматривающему введение Соединения D. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML, который приобрел устойчивость к лечению венетоклаксом, предусматривающему введение комбинации Соединения D и ингибитора BCL2. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML, который приобрел устойчивость к лечению венетоклаксом, предусматривающему введение комбинации Соединения D и венетоклакса.

[00291] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором топоизомеразы. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором топоизомеразы. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором топоизомеразы. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором топоизомеразы, например, иринотеканом, топотеканом, камптотецином, ламелларином D, этопозидом, тенипозидом, доксорубицином, даунорубицином, митоксантроном, амсакрином, эллиптицином, ауринтрикарбоновой кислотой или HU-331. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитором топоизомеразы является топотекан.

[00292] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором BET. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором BET. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор BET выбран из GSK525762A, OTX015, BMS-986158, TEN-010, CPI-0610, INCB54329, BAY1238097, FT-1101, C90010, ABBV-075, BI 894999, GS-5829, GSK1210151A (I-BET-151), CPI-203, RVX 208, XD46, MS436,

PFI-1, RVX2135, ZEN3365, XD14, ARV-771, MZ-1, PLX5117, 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-она (Соединение А), EP11313 и EP11336.

[00293] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с лейкемией в комбинации с ингибитором LSD1. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам с AML в комбинации с ингибитором LSD1. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор LSD1 выбран из ORY-1001, ORY-2001, INCB-59872, IMG-7289, TAK 418, GSK-2879552 и 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метокси-фенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фтор-бензонитрила или его соли (например, безилатная соль, Соединение В).

[00294] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с лейкемией в комбинации с триптолидом, ретаспимицином, альвеспимицином, 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-оном (CC-223), 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-оном (CC-115), рапамицином, MLN-0128, эверолимусом, AZD8055, пладиенолидом В, топотеканом, тиогуанином, митоксантроном, этопозидом, децитабином, даунорубицином, клофарабином, кладрибином, 6-меркаптопурином, хлор-N,N-диэтил-5-((4-(2-(4-(3-метилуреидо)фенил)пиридин-4-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензолсульфонамидом (соединение Ii), федратинибом, сунитинибом, пексидартинибом, мидостаурином, лестауртинибом, момелотинибом, квизартинибом и креноланибом.

[00295] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с AML в комбинации с триптолидом, ретаспимицином, альвеспимицином, 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-оном (CC-223), 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-оном (CC-115), рапамицином, MLN-0128, эверолимусом, AZD8055, пладиенолидом В, топотеканом, тиогуанином, митоксантроном, этопозидом, децитабином, даунорубицином, клофарабином, кладрибином, 6-меркаптопурином, хлор-N,N-диэтил-5-((4-(2-(4-(3-метилуреидо)фенил)пиридин-4-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензолсульфонамидом (соединение Ii), федратинибом, сунитинибом, пексидартинибом, мидостаурином, лестауртинибом, момелотинибом, квизартинибом и креноланибом.

[00296] Согласно одному аспекту способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение Соединения D пациентам с раком в комбинации с ингибитором mTOR, где рак выбран из рака молочной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака легких, нейроэндокринной опухоли (NET) и почечноклеточного рака (RCC). Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с раком в комбинации с ингибитором топоизомеразы. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с раком в комбинации с ингибитором mTOR, где рак выбран из рака молочной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака легких, нейроэндокринной опухоли (NET) и почечноклеточного рака. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор mTOR выбран из эверолимуса, MLN-0128 и AZD8055. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибитор киназы mTOR. Согласно определенным вариантам осуществления ингибитор киназы mTOR выбран из 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пирозин-2(1H)-она (CC-223) и 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пирозин-2(1H)-она (CC-115). Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((транс)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пирозин-2(1H)-он (CC-223). Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой 1-этил-7-(2-метил-6-(1H-1,2,4-триазол-3-ил)пиридин-3-ил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пирозин-2(1H)-он (CC-115). Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой эверолимус. Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой темсиролимус. Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой MLN-0128. Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы mTOR представляет собой AZD8055.

[00297] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим раком молочной железы, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим раком молочной железы, в комбинации с эверолимусом.

[00298] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим раком почки, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим раком почки, в комбинации с эверолимусом.

[00299] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим раком поджелудочной железы, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим раком поджелудочной железы, в комбинации с эверолимусом.

[00300] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим раком желудочно-кишечного тракта, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим раком желудочно-кишечного тракта, в комбинации с эверолимусом.

[00301] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим раком легких, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим раком легких, в комбинации с эверолимусом.

[00302] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим нейроэндокринной опухолью, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим нейроэндокринной опухолью, в комбинации с эверолимусом.

[00303] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят пациентам, страдающим почечноклеточным раком, в комбинации с эверолимусом. Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам, страдающим почечноклеточным раком, в комбинации с эверолимусом.

[00304] Настоящее изобретение также относится к способу увеличения дозы противоракового лекарственного средства или агента, которую можно безопасно и эффективно вводить пациенту, который предусматривает введение пациенту (например, человеку) Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в

комбинации со вторым противораковым лекарственным средством. Пациенты, которые могут получить пользу от этого способа, представляют собой тех, которые вероятно страдают от побочных эффектов, связанных с противораковыми лекарственными средствами для лечения определенного рака кожи, подкожной ткани, лимфатических узлов, головного мозга, легких, печени, костей, кишечника, толстой кишки, сердца, поджелудочной железы, надпочечников, почек, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки или их комбинации. Введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, облегчает или уменьшает неблагоприятные эффекты, которые настолько серьезны, что в противном случае это ограничивало бы количество противоракового лекарственного средства.

[00305] Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения дозы противоракового лекарственного средства или агента, которую можно безопасно и эффективно вводить пациенту, который предусматривает введение пациенту (например, человеку) Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в комбинации со вторым противораковым лекарственным средством. Пациенты, которые могут получить пользу от этого способа, представляют собой тех, которые вероятно страдают от побочных эффектов, связанных с противораковыми лекарственными средствами для лечения определенного рака кожи, подкожной ткани, лимфатических узлов, головного мозга, легких, печени, костей, кишечника, толстой кишки, сердца, поджелудочной железы, надпочечников, почек, предстательной железы, молочной железы, толстой кишки или их комбинации. Введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, усиливает активность противоракового лекарственного средства, что позволяет снизить дозу противоракового лекарственного средства при сохранении эффективности, что, в свою очередь, может облегчить или уменьшить побочные эффекты, которые настолько серьезны, что ограничивают количество противоракового лекарственного средства.

[00306] Согласно одному варианту осуществления Соединение D вводят ежедневно в количестве в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 15 мг, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг или от приблизительно 1 до приблизительно 15 мг до, во время или после возникновения побочного эффекта, связанного с введением пациенту противоракового лекарственного средства. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D вводят в комбинации со специфическими агентами, такими как гепарин, аспирин, кумадин или G-CSF,

чтобы избежать побочных эффектов, связанных с противораковыми лекарственными средствами, таких как без ограничения нейтропения или тромбоцитопения.

[00307] Согласно одному варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с заболеваниями и нарушениями, связанными с или характеризующимися нежелательным ангиогенезом, в комбинации с дополнительными активными ингредиентами, включая без ограничения противораковые лекарственные средства, противовоспалительные средства, антигистаминные средства, антибиотики и стероиды.

[00308] Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики и/или контроля рака, который предусматривает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в сочетании с (например, до, во время или после) по меньшей мере одной противораковой терапией, включая без ограничения хирургическое вмешательство, иммунотерапию, биологическую терапию, лучевую терапию или другую немедикаментозную терапию, используемую в настоящее время для лечения, профилактики и/или контроля рака. Комбинированное применение соединения, раскрытого в настоящем документе, и другой противораковой терапии может обеспечить уникальную схему лечения, которая неожиданно эффективна у некоторых пациентов. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что Соединение D может оказывать аддитивное или синергетическое действие при одновременном применении с по меньшей мере одной противораковой терапией.

[00309] Как раскрыто в настоящем документе, настоящее изобретение относится к способу уменьшения, лечения и/или предотвращения неблагоприятных или нежелательных эффектов, связанных с другой противораковой терапией, включая без ограничения хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, биологическую терапию и иммунотерапию. Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, и другой активный ингредиент можно вводить пациенту до, во время или после возникновения неблагоприятного эффекта, связанного с другой противораковой терапией.

[00310] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение одной или нескольких из добавки кальция, кальцитриола или витамина D с Соединением D. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение

добавки кальция, кальцитриола и витамина D до лечения Соединением D. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D до введения первой дозы Соединения D в каждом цикле. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D по меньшей мере за до 3 дней до лечения Соединением D. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D до введения первой дозы Соединения D в каждом цикле. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D по меньшей мере за до 3 дней до введения первой дозы Соединения D в каждом цикле. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D до введения первой дозы Соединения D в каждом цикле и продолжение после введения последней дозы Соединения D в каждом цикле. Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D по меньшей мере за до 3 дней до введения первой дозы Соединения D в каждом цикле и продолжение за по меньшей мере до 3 дней после введения последней дозы Соединения D в каждом цикле (например, по меньшей мере до дня 8, когда Соединение D вводят в дни 1-5). Согласно одному варианту осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение добавки кальция, кальцитриола и витамина D по меньшей мере за до 3 дней до дня введения 1 каждого цикла и продолжение до ≥ 3 дней после последней дозы Соединения D в каждом цикле (например, $\geq$ день 8, когда Соединение D вводят в дни 1-5, $\geq$ день 13, когда Соединение D вводят в дни 1-3 и дни 8-10).

[00311] Согласно определенным вариантам осуществления добавку кальция вводят для доставки по меньшей мере 1200 мг элементарного кальция в день, вводимых в виде разделенных доз. Согласно определенным вариантам осуществления добавку кальция вводят в виде карбоната кальция при дозе 500 мг, вводимых три раза в день перорально (PO).

[00312] Согласно определенным вариантам осуществления добавку кальцитриола вводят для доставки 0,25 мкг кальцитриола (PO) один раз в день.

[00313] Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 500 МЕД до приблизительно 50000 МЕД витамина D один раз в день. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 1000 МЕД витамина D один раз в день. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 50000 МЕД витамина D один раз в неделю. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 1000 МЕД витамина D2 или D3 один раз в день. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 500 МЕД витамина D один раз в день. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 50000 МЕД витамина D один раз в неделю. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 20000 МЕД витамина D один раз в неделю. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 1000 МЕД витамина D2 или D3 один раз в день. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 50000 МЕД витамина D2 или D3 один раз в неделю. Согласно определенным вариантам осуществления добавку витамина D вводят для доставки приблизительно 20000 МЕД витамина D2 или D3 один раз в неделю.

[00314] Согласно определенным вариантам осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе и доксетаксол вводят пациентам с немелкоклеточным раком легкого, которые ранее получали лечение карбо/VP 16 и лучевой терапией.

[00315] Использование с трансплантационной терапией

[00316] Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, можно использовать для снижения риска реакции трансплантата против хозяина (GVHD). Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики и/или контроля рака, который предусматривает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в комбинации с трансплантационной терапией.

[00317] Как известно специалистам в данной области техники, лечение рака часто основано на стадиях и механизме заболевания. Например, поскольку на определенных стадиях рака развивается неизбежная лейкозная трансформация, может потребоваться трансплантация

стволовых клеток периферической крови, препарата гемопоэтических стволовых клеток или костного мозга. Комбинированное применение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, и трансплантационной терапии обеспечивает уникальный и неожиданный синергизм. В частности, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, проявляет иммуномодулирующую активность, которая может обеспечивать аддитивные или синергетические эффекты при одновременном введении с трансплантационной терапией пациентам с раком.

[00318] Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, может работать в комбинации с трансплантационной терапией, уменьшая осложнения, связанные с инвазивной процедурой трансплантации, и риск GVHD. Настоящее изобретение относится к способу лечения, профилактики и/или контроля рака, который предусматривает введение пациенту (например, человеку) состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, до, во время или после трансплантации пуповинной крови, плацентарной крови, стволовых клеток периферической крови, препарата гемопоэтических стволовых клеток или костного мозга. Некоторые примеры стволовых клеток, пригодных для использования в раскрытых в настоящем документе способах, раскрыты в патенте США № 7498171, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полное.

[00319] Согласно одному варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с острым миелолейкозом до, в ходе или после трансплантации.

[00320] Согласно одному варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с множественной миеломой до, в ходе или после трансплантации аутологичных клеток-предшественников периферической крови.

[00321] Согласно одному варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят пациентам с NHL (например, DLBCL) до, в ходе или после трансплантации аутологичных клеток-предшественников периферической крови.

[00322] Циклическая терапия

[00323] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, циклически вводят пациенту, независимо от того, какой вид рака подлежит лечению. Циклическая терапия предусматривает введение активного агента в течение определенного периода времени с последующим отдыхом в течение определенного периода времени и повторением этого последовательного введения. Циклическая терапия может снизить развитие устойчивости к одному или нескольким видам терапии, избежать или уменьшить побочные эффекты одного из видов терапии и/или повысить эффективность лечения.

[00324] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят ежедневно в виде однократной или разделенной дозы в течение четырех-шести-недельного цикла с периодом отдыха приблизительно одна или две недели. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят ежедневно в виде однократной или разделенной дозы в течение от одного до десяти дней подряд 28-ми дневного цикла, затем следует период отдыха без введения в течение периода отдыха в течение 28-дневного цикла. Кроме того, циклический способ позволяет увеличить частоту, количество и продолжительность циклов введения дозы. Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к введению Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в течение большего количества циклов, чем обычно, когда его вводят отдельно. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят в течение большего количества циклов чем то, которое обычно вызывает дозолимитирующую токсичность у пациента, которому также не вводят второй активный ингредиент.

[00325] Согласно одному варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят ежедневно и непрерывно в течение трех или четырех недель с введением дозы Соединения D от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/день, с последующим перерывом в одну или две недели.

[00326] Согласно другому варианту осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят внутривенно и второй активный ингредиент вводят перорально, причем введение Соединения D, например, состава

Соединения D, раскрытого в настоящем документе, происходит за 30 - 60 минут до второго активного ингредиента, в ходе цикла от четырех до шести недель. Согласно определенным вариантам осуществления комбинацию Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, и второго активного ингредиента вводят посредством внутривенной инфузии в течение приблизительно 90 минут каждого цикла. Согласно определенным вариантам осуществления один цикл предусматривает введение от приблизительно 0,1 до приблизительно 150 мг/день Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, и от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг/м2/день второго активного ингредиента, ежедневно, в течение от трех до четырех недель, и затем следует одна или две недели отдыха. Согласно определенным вариантам осуществления количество циклов, в течение которых комбинированное лечение вводят пациенту, составляет от приблизительно одного до приблизительно 24 циклов, от приблизительно двух до приблизительно 16 циклов или от приблизительно четырех до приблизительно трех циклов.

[00327] Согласно одному варианту осуществления циклическая терапия, раскрытая в настоящем документе, предусматривает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в цикле лечения, который включает период введения до 5 дней с последующим периодом отдыха. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения 5 дней с последующим периодом отдыха. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения до 10 дней с последующим периодом отдыха. Согласно одному варианту осуществления период отдыха составляет от приблизительно 10 дней до приблизительно 40 дней. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения до 10 дней с последующим периодом отдыха от приблизительно 10 дней до приблизительно 40 дней. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения до 10 дней с последующим периодом отдыха от приблизительно 23 дней до приблизительно 37 дней. Согласно одному варианту осуществления период отдыха составляет от приблизительно 23 дней до приблизительно 37 дней. Согласно одному варианту осуществления период отдыха составляет 23 дней. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения до 10 дней с последующим периодом отдыха 23 дня. Согласно одному варианту осуществления период отдыха составляет 37 дня. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает период введения до 10 дней с последующим периодом отдыха 37 дней.

[00328] Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в дни 1 - 10 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 5 42-х дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 10 42-х дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 3 и 8 - 10 28-ми дневного цикла.

[00329] Согласно одному варианту осуществления цикл лечения включает введение Соединения D, например, состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в дни 1 - 21 28-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 5 7-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления цикл лечения включает введение в дни 1 - 7 7-ми дневного цикла.

[00330] Любой цикл лечения, описанный в настоящем документе, можно повторять в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более циклов. В определенных случаях цикл лечения как описано в настоящем документе включает от 1 до приблизительно 24 циклов, от приблизительно 2 до приблизительно 16 циклов или от приблизительно 2 до приблизительно 4 циклов. В определенных случаях цикл лечения, как описано в настоящем документе, включает от 1 до приблизительно 4 циклов. Согласно определенным вариантам осуществления цикл 1 - 4 все представляют собой 28-ми дневные циклы. Согласно определенным вариантам осуществления цикл 1 представляет собой 42-х дневный цикл, а циклы 2 - 4 представляют собой 28-ми дневные циклы. Согласно некоторым вариантам осуществления Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят в течение от 1 до 13 циклов из 28 дней (например, приблизительно 1 год). В некоторых случаях циклическая терапия не ограничена количеством циклов, и терапия продолжается до тех пор, пока не прекратиться прогрессирование заболевания. Циклы могут в некоторых случаях включать изменение продолжительности периодов введения и/или периодов отдыха, описанных в настоящем документе.

[00331] Согласно одному варианту осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,3 мг/день, 0,6 мг/день, 1,2 мг/день,

1,8 мг/день, 2,4 мг/день, 3,6 мг/день, 5,4 мг/день, 7,2 мг/день, 8,1 мг/день, 9,0 мг/день, 10,0 мг/день, 10,8 мг/день или 12,2 мг/день, вводимом один раз в день. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,3 мг/день, 0,6 мг/день, 1,2 мг/день, 1,8 мг/день, 2,4 мг/день, 3,6 мг/день, 5,4 мг/день, 7,2 мг/день, 8,1 мг/день, 9,0 мг/день, 10,0 мг/день, 10,8 мг/день, 12,2 мг/день или 20 мг/день, вводимом один раз в день. Согласно одному варианту осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,6 мг/день, 1,2 мг/день, 1,8 мг/день, 2,4 мг/день или 3,6 мг/день, вводимом один раз в день. Согласно некоторым таким вариантам осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,6 мг, 1,2 мг, 1,8 мг, 2,4 мг или 3,6 мг в дни 1 - 3 28-ми дневного цикла. Согласно другим вариантам осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,6 мг, 1,2 мг, 1,8 мг, 2,4 мг или 3,6 мг в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла. Согласно другим вариантам осуществления цикл лечения предусматривает введение Соединения D в количестве дозы приблизительно 0,6 мг, 1,2 мг, 1,8 мг, 2,4 мг, 3,6 мг, 5,4 мг/день, 7,2 мг/день, 8,1 мг/день, 9,0 мг/день или 10,0 мг/день, в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла.

[00332] Соединение D, например, состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, можно вводить при одном и том же количестве для всех периодов введения в ходе цикла лечения. Альтернативно, согласно одному варианту осуществления соединение вводят при разных дозах в периоды введения.

[00333] Согласно одному варианту осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят субъекту в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава в течение по меньшей мере 5 дней 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе, вводят субъекту в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 10 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав Соединения D, раскрытый в настоящем документе,

вводят субъекту в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления состав вводят для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 10 мг в дни 1 - 5 и 15 - 19 28-ми дневного цикла.

[00334] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в течение по меньшей мере 5 дней 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 и 15 до 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от

приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 и 15 до 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения AML путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 и 15 до 19 28-ми дневного цикла.

[00335] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в течение по меньшей мере 5 дней 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 28-ми дневного цикла. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг в дни 1 - 5 и 15 до 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 и 15 до 19 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу

лечения MDS путем введения субъекту состава Соединения D, раскрытого в настоящем документе, в ходе цикла, где цикл предусматривает введение состава для доставки Соединения D при дозе от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5 мг в дни 1 - 5 и от 15 до 19 28-ми дневного цикла.

5.3. Способы обнаружения и количественного определения наборов генов или биомаркеров

[00336] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам обнаружения и количественного определения уровня РНК (например, мРНК) набора генов, такого как генная сигнатура или биомаркера, раскрытых в настоящем документе, в биологическом образце. Способы обнаружения и количественного определения уровня мРНК набора генов включают любые способы, известные в данной области техники, которые могут обнаруживать или количественно определять мРНК, такие как транскриптомное профилирование, количественная ОТ-ПЦР (qRT-PCR), анализы рибонуклеазной защиты, нозерн-блоттинг и т.д.

[00337] Любая подходящая платформа для анализа может быть использована для определения присутствия мРНК в образце. Например, анализ может быть в форме полоски для измерения уровня, мембраны, чипа, диска, тест-полоски, фильтра, микросферы, предметного стекла, многолуночного планшета или оптического волокна. Система анализа может иметь твердую подложку, к которой прикреплена нуклеиновая кислота, соответствующая мРНК. Твердая подложка может включать, например, пластик, кремний, металл, смолу, стекло, мембрану, частицу, осадок, гель, полимер, лист, сферу, полисахарид, капилляр, пленку, пластинку или слайд. Компоненты анализа могут быть приготовлены и упакованы вместе в виде набора для обнаружения мРНК.

[00338] Нуклеиновая кислота может иметь метку, если это необходимо, с получением популяции меченных мРНК. В общем, образец можно пометить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники (например, с использованием ДНК-лигазы, терминальной трансферазы или путем введения метки в остов РНК и т.д.) См., например, Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (Wiley & Sons, 3rd ed. 1995), Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd ed. 2001). Согласно некоторым вариантам осуществления образец метят флуоресцентной меткой. Примеры флуоресцентных красителей включают без ограничения ксантеновые красители,

флуоресцеиновые красители (например, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), 6-карбокси-2',4',7',4,7-гексахлорфлуоресцеин (HEX), 6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (JOE)), родаминовые красители (например, родамин 110 (R110), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (ТАМРА), 6-карбокси-Х-родамин (ROX), 5-карбоксиродамин 6G (R6G5 или G5), 6-карбоксиродамин 6G (R6G6 или G6)), цианиновые красители (например, Cy3, Cy5 и Cy7), красители Alexa (например, Alexa-фтор-555), кумарин, диэтиламинокумарин, умбеллиферон, бензимидазные красители (например, Hoechst 33258), фенантридиновые красители (например, техасский красный), этидиевые красители, акридиновые красители, карбазоловые красители, феноксазиновые красители, порфириновые красители, полиметиновые красители, красители BODIPY, хинолиновые красители, пирен, флуоресцеин хлортриазинил, эозиновые красители, тетраметилродамин, лиссамин, нафтофлуоресцеин и тому подобное.

[00339] Примеры способов ПЦР можно найти в патенте США № 6927024, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Примеры способов ОТ-ПЦР можно найти в патенте США № 7122799, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Способ флуоресцентной ПЦР *in situ* описан в патенте США № 7186507, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00340] Согласно некоторым вариантам осуществления qRT-PCR можно использовать как для обнаружения, так и для количественного определения РНК-мишеней (Bustin *et al.*, *Clin. Sci.* 2005, 109:365-379). Количественные результаты, полученные с помощью qRT-PCR, как правило, более информативны, чем качественные данные. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления анализа на основе qRT-PCR могут быть полезны для измерения уровней мРНК в ходе анализов на основе клеток. Способ qRT-PCR также полезен для контроля лечения пациентов. Примеры способов, основанных на qRT-PCR, можно найти, например, в патенте США № 7101663, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Устройства для qRT-PCR, такие как Applied Biosystems 7500, доступны в продаже, как и реагенты, такие как TaqMan® Sequence Detection Chemistry. Например, можно использовать анализы экспрессии генов TaqMan®, следуя инструкциям производителя. Эти наборы представляют собой заранее подготовленные анализы экспрессии генов для быстрого, надежного обнаружения и количественного определения транскриптов мРНК человека, мыши и крысы. Иллюстративная программа qRT-

PCR, например, составляет 50 °C в течение 2 минут, 95 °C в течение 10 минут, 40 циклов 95 °C в течение 15 секунд, затем 60 °C в течение 1 минуты.

[00341] Для того, чтобы определить число циклов, при котором сигнал флуоресценции, связанный с конкретным накоплением ампликона, пересекает пороговое значение (называемое C_T), данные можно анализировать, например, с использованием программного обеспечения 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection по сравнению с использованием сравнительного способа относительного количественного вычисления C_T . При использовании этого способа результат выражается в виде кратного изменения уровней экспрессии. Согласно некоторым вариантам осуществления пороговый уровень может быть выбран для автоматического определения программным обеспечением. Согласно некоторым вариантам осуществления пороговый уровень устанавливают выше базового уровня, но достаточно низким, чтобы он был в пределах области экспоненциального роста кривой амплификации.

[00342] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам обнаружения и количественного определения уровня кДНК набора генов, такого как генная сигнатура, или биомаркера, раскрытых в настоящем документе, в биологическом образце. Согласно определенным вариантам осуществления способы дополнительно предусматривают получение кДНК из мРНК, полученной из образца. В данном случае можно использовать любые известные в данной области техники способы получения кДНК из мРНК. Способы обнаружения и количественного определения уровня кДНК в наборе генов включают любые способы, известные в данной области техники, которые могут обнаруживать или количественно определять кДНК, такие как ДНК-микрочипы, высокопроизводительное секвенирование, Саузерн-блоттинг и т.д.

[00343] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам обнаружения и количественного определения уровня белка набора генов, такого как генная сигнатура, или биомаркера, раскрытых в настоящем документе, в биологическом образце. Способы обнаружения и количественного определения уровня белка в наборе генов включают любые методы, известные в данной области техники, которые могут обнаруживать или количественно определять белки, такие как масс-спектрометрия, иммуногистохимия, проточная цитометрия, цитометрический массив шариков, ELISA, вестерн-блоттинг и т.д. Несколько типов ELISA широко используются, включая прямой анализ ELISA, непрямой анализ ELISA и сэндвич-анализ ELISA.

5.4. Субъекты и образцы

[00344] Согласно определенным вариантам осуществления в различных способах, раскрытых в настоящем документе, применяю образцы (например, биологические образцы), взятые у субъектов или индивидуумов (например, пациентов). Субъектом может быть пациент, как например пациент, страдающий раком (например, лимфомой, ММ или лейкозом). Субъектом может быть млекопитающее, например, человек. Субъект может быть мужского или женского рода, и может быть взрослым, ребенком или младенцем. Образцы можно анализировать во время активной фазы рака (например, лимфомы, ММ или лейкоза), или когда рак (например, лимфома, ММ или лейкоз) неактивен. Согласно определенным вариантам осуществления более чем один образец может быть взят у субъекта.

[00345] Согласно определенным вариантам осуществления образец, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, содержит жидкости организма субъекта. Неограничивающие примеры жидкостей организма включают кровь (например, цельную кровь), плазму крови, амниотическую жидкость, водянистую влагу, желчь, ушную серу, жидкость Купера, предэякуляторную жидкость, хилус, химус, женский эякулят, интерстициальную жидкость, лимфу, менструальные выделения, грудное молоко, слизь, плевральную жидкость, гной, слюну, кожное сало, сперму, сыворотку, пот, слезы, мочу, вагинальную смазку, рвоту, воду, фекалии, внутренние жидкости организма (включая спинномозговую жидкость, окружающую головной и спинной мозг), синовиальную жидкость, внутриклеточную жидкость (жидкость внутри клеток) и стекловидное тело (жидкость в глазном яблоке). Согласно некоторым вариантам осуществления образец представляет собой образец крови. Образец крови может быть получен с использованием обычных способов, как описано в, например, Innis *et al*, eds., PCR Protocols (Academic Press, 1990). Белые кровяные тельца можно выделить из образцов крови с помощью обычных способов или имеющихся в продаже наборов, например, набора RosetteSep (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canada). Субпопуляции белых кровяных телец, например, мононуклеарные клетки, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты или лимфоциты, могут быть дополнительно выделены с использованием обычных способов, например, активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) или сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

[00346] Согласно одному варианту осуществления образец крови составляет от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 10,0 мл, от приблизительно 0,2 мл до

приблизительно 7 мл, от приблизительно 0,3 мл до приблизительно 5 мл, от приблизительно 0,4 мл до приблизительно 3,5 мл или от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 3 мл. Согласно другому варианту осуществления образец крови составляет приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1,0, приблизительно 1,5, приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5, приблизительно 4,0, приблизительно 4,5, приблизительно 5,0, приблизительно 6,0, приблизительно 7,0, приблизительно 8,0, приблизительно 9,0 или приблизительно 10,0 мл.

[00347] Согласно некоторым вариантам осуществления образец, используемый в способах согласно настоящему изобретению, включает биопсию (например, биопсию опухоли). Биопсия может быть взята из любого органа или ткани, например, кожи, печени, легкого, сердца, толстой кишки, почки, костного мозга, зубов, лимфатического узла, волос, селезенки, головного мозга, молочной железы или других органов. Любой способ биопсии, известный специалистам в данной области техники, может быть использован для взятия образца у субъекта, например, открытая биопсия, закрытая биопсия, центральная биопсия, инцизионная биопсия, эксцизионная биопсия или тонкоигольная аспирационная биопсия.

[00348] Согласно одному варианту осуществления образец, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, получают у субъекта до того, как субъект получает лечение от заболевания или нарушения. Согласно другому варианту осуществления образец получают у субъекта во время лечения субъекта от заболевания или нарушения. Согласно другому варианту осуществления образец получают у субъекта после того, как субъект получил лечение от заболевания или нарушения. Согласно различным вариантам осуществления лечение предусматривает введение соединения (например, соединения, представленного в разделе 5.5 ниже) субъекту.

5.1. Типы клеток

[00349] Согласно определенным вариантам осуществления образец, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, содержит множество клеток, таких как раковые (например, лимфома, ММ или лейкоз) клетки. Такие клетки могут включать любой тип клеток, например, стволовые клетки, клетки крови (например, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC)), лимфоциты, В-клетки, Т-клетки, моноциты, гранулоциты, иммунные клетки или раковые клетки.

[00350] В-клетки (В-лимфоциты) включают, например, В-клетки плазмы, В-клетки памяти, В1-клетки, В2-клетки, В-клетки маргинальной зоны и фолликулярные В-клетки. В-клетки могут экспрессировать иммуноглобулины (антитела) и В-клеточный рецептор.

[00351] Конкретные клеточные популяции могут быть получены с использованием комбинации имеющихся в продаже антител (например, антитела от Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, California) или Dako (Denmark)).

[00352] Согласно определенным вариантам осуществления клетки в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой РВМС. Согласно определенным вариантам осуществления образец, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, получен из ткани, пораженной заболеванием, например, у человека, страдающего раком (например, лимфома, ММ или лейкоз).

[00353] Согласно определенным вариантам осуществления клеточные линии используются в качестве моделей заболеваний для оценки эффектов Соединений, изучения механизмов действия или установления эталонных уровней биомаркеров и т.д. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, получены из клеточной линии рака (например, AML). Согласно определенным вариантам осуществления клетки получены из клеточной линии лимфомы. Согласно другому варианту осуществления клетки получены из клеточной линии ММ. Согласно другому варианту осуществления клетки получены из лейкозной клеточной линии. Согласно некоторым вариантам осуществления лейкозная клеточная линия представляет собой клеточную линию CLL. Согласно другому варианту осуществления лейкозная клеточная линия представляет собой клеточную линию ALL. Согласно другому варианту осуществления лейкозная клеточная линия представляет собой клеточную линию CML. Согласно другому варианту осуществления лейкозная клеточная линия представляет собой клеточную линию AML. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию KG-1. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию KG-1a. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию KASUMI-1. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию NB4. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию MV-4-11. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию MOLM-13. Согласно другому варианту осуществления

клеточная линия AML представляет собой клеточную линию HL-60. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию U -937. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию OCI-AML2. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию OCI-AML3. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию HNT-34. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию ML-2. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию AML-193. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию F36-P. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию KASUMI-3. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию MUTZ-8. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию GDM-1. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию SIG-M5. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию TF-1. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию Nomo-1. Согласно одному варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию UT-7. Согласно другому варианту осуществления клеточная линия AML представляет собой клеточную линию THP-1.

[00354] Согласно определенным вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, полезны для обнаружения реаранжировки генов в клетках здорового человека. Согласно определенным вариантам осуществления число клеток, используемых в способах, раскрытых в настоящем документе, может варьироваться от одной клетки до приблизительно 10^9 клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления число клеток, используемых в способах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 1×10^4 , приблизительно 5×10^4 , приблизительно 1×10^5 , приблизительно 5×10^5 , приблизительно 1×10^6 , приблизительно 5×10^6 , приблизительно 1×10^7 , приблизительно 5×10^7 , приблизительно 1×10^8 , приблизительно 5×10^8 или приблизительно 1×10^9 .

[00355] Число и тип клеток, собранных у субъекта, можно контролировать, например, путем измерения изменений маркеров клеточной поверхности с использованием стандартных способов обнаружения клеток, таких как проточная цитометрия, сортировка

клеток, иммуноцитохимия (например, окрашивание тканеспецифическими или клеточными антителами, специфичными к маркеру), сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS), активируемая магнитным полем сортировка клеток (MACS), путем изучения морфологии клеток с помощью световой или конфокальной микроскопии, и/или путем измерения изменений в экспрессии генов с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, такие как ПЦР и профилирование экспрессии генов. Эти способы также можно использовать для выявления клеток, положительных по одному или нескольким конкретным маркерам.

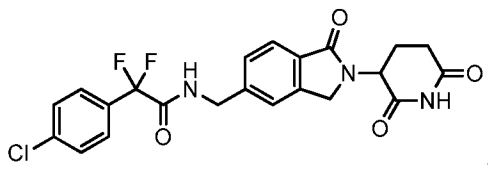
[00356] Согласно определенным вариантам осуществления в способах, раскрытых в настоящем документе, используют подмножества клеток. Способы сортировки и выделения конкретных популяций клеток хорошо известны в данной области техники и могут основываться на размере клеток, морфологии или внутриклеточных или внеклеточных маркерах. Такие способы включают без ограничения проточную цитометрию, проточную сортировку, FACS, разделение на основе шариков, такое как сортировка магнитных клеток, разделение по размеру (например, сито, набор препятствий или фильтр), сортировку в микрожидкостном устройстве, разделение на основе антител, седиментацию, аффинную адсорбцию, аффинную экстракцию, центрифугирование в градиенте плотности, микродиссекцию с лазерным захватом и т.д. FACS представляет собой хорошо известный способ разделения частиц, включая клетки, основанный на флуоресцентных свойствах частиц (Kamarch, *Methods Enzymol.* 1987, 151:150-165). Лазерное возбуждение флуоресцентных фрагментов в отдельных частицах приводит к небольшому электрическому заряду, позволяющему электромагнитно отделять положительные и отрицательные частицы от смеси. Согласно одному варианту осуществления антитела или лиганды, специфичные к маркерам клеточной поверхности, метят отдельными флуоресцентными метками. Клетки обрабатывают с помощью сортировщика клеток, позволяющего разделять клетки на основе их способности связываться с используемыми антителами. Частицы, отсортированные с помощью FACS, могут быть непосредственно помещены в отдельные лунки 96-луночных или 384-луночных планшетов для облегчения разделения и клонирования.

[00357] Согласно одному варианту осуществления РНК (например, мРНК) или белок очищают от опухоли, и уровень набора генов измеряют с помощью анализа экспрессии мРНК или белка. Согласно определенным вариантам осуществления уровень набора генов измеряют с помощью транскриптного профилирования, qRT-PCR, микрочипов,

высокопроизводительного секвенирования или других подобных способов, известных в данной области техники. Согласно другим вариантам осуществления уровень набора генов измеряют с помощью ELISA, проточной цитометрии, иммунофлуоресценции или других подобных способов, известных в данной области техники.

5.5. Соединения

[00358] Соединение, подходящее для применения в способах и составах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой Соединение D: 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид, имеющее структуру:



или его стереоизомеры или смесь стереоизомеров, изотопологи, фармацевтически приемлемые соли, таутомеры, сольваты, гидраты, сокристаллы, клатраты или полиморфы. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D представляет собой 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид.

[00359] Соединение D могут быть получены в соответствии со способами, описанными в приведенных в настоящем документе примерах, или как описано в патенте США № 9499514, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Соединение также может быть синтезировано в соответствии с другими способами, очевидными для специалистов в данной области техники, на основании представленного в настоящем документе раскрытия.

[00360] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D является твердым. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D представляет собой гидрат. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D является сольватированным. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D является безводным.

[00361] Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D является аморфным. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D является кристаллическим. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D

находится в кристаллической форме, описанной в публикации США № 2017-0197934, поданной 6 января 2017 г., которая полностью в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00362] Твердые формы Соединения D могут быть получены в соответствии со способами, описанными в раскрытии публикации США № 2017-0197934, поданной 6 января 2017 г. Твердые формы также могут быть получены в соответствии с другими способами, очевидными для специалистов в данной области техники.

[00363] Согласно одному варианту осуществления Соединение D представляет собой полиморфную форму A, форму B, форму C, форму D, форму E или аморфную форму 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида. Полиморфы 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида кратко описаны в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления Соединение D имеет полиморфную форму, как описано в публикации США № 2019/0030018, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, и часть которой описана более подробно ниже.

[00364] Форма A 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00365] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, получены из Формы A Соединения D.

[00366] Согласно одному варианту осуществления Форма A представляет собой безводную форму Соединения D. Согласно другому варианту осуществления Форма A Соединения D является кристаллической.

[00367] Согласно определенным вариантам осуществления Форму A получают путем кристаллизации из определенных систем растворителей, например, систем растворителей, содержащих один или несколько следующих растворителей: ацетон и смесь растворителей изопропанола и воды при комнатной температуре. Согласно определенным вариантам осуществления Форму A получают в виде промежуточной твердой формы из суспензий при повышенной температуре, например, приблизительно 50 °C, в смеси этанол/вода (1:1), ацетон или ацетонитрил.

[00368] Согласно определенным вариантам осуществления Форма А является по существу кристаллической, как указано посредством, например, измерения рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно одному варианту осуществления Форма А Соединения D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 2 публикации США № 2019/0030018.

[00369] Согласно одному варианту осуществления Форма А Соединения D имеет один или несколько характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 11,5, 15,6, 16,6, 17,2, 18,1, 19,0, 19,6, 21,1, 23,2 или 24,8 градусов 2θ , как показано на фиг. 2 публикации США № 2019/0030018. Согласно другому варианту осуществления Форма А Соединения D имеет один, два, три или четыре характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 15,6, 16,6, 17,2 или 24,8 градусов 2θ . Согласно другому варианту осуществления Форма А Соединения D имеет один, два, три, четыре, пять, шесть или семь характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице А. Согласно другому варианту осуществления Форма А Соединения D имеет один, два или три характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице А.

Таблица А

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
1	7,23	12,2187	17,6
2	11,52	7,6789	29,7
3	15,22	5,8209	7,5
4	15,62	5,6720	31,2
5	16,58	5,3466	40,3
6	17,19	5,1576	100,0
7	18,08	4,9056	22,3
8	19,00	4,6702	19,6
9	19,60	4,5302	22,1
10	21,05	4,2197	29,2
11	21,74	4,0884	8,3

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
12	22,01	4,0388	7,1
13	22,47	3,9576	6,0
14	23,22	3,8312	28,6
15	24,17	3,6825	5,6
16	24,77	3,5945	57,2
17	25,59	3,4813	14,6
18	25,94	3,4356	10,5
19	26,63	3,3470	17,4
20	27,73	3,2172	10,0
21	28,51	3,1307	7,1
22	29,88	2,9906	19,3
23	30,76	2,9065	7,1
24	31,59	2,8327	11,1
25	34,82	2,5766	4,8
26	36,05	2,4913	4,3

[00370] Согласно одному варианту осуществления Форма А Соединения D имеет изображение SEM, как изложено на фиг. 3 публикации США № 2019/0030018.

[00371] Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма Соединения D имеет термогравиметрическую (TGA) термограмму, в основном соответствующую репрезентативной термограмме TGA, как показано на фиг. 4 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления для Формы А не наблюдается потери массы TGA.

[00372] Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма А Соединения D имеет термограмму DSC, по существу соответствующую как показано на фиг. 5 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления Форма А характеризуется графиком DSC, включающим плавление с начальной температурой 229 °C и теплотой плавления 118 Дж/г.

[00373] Согласно определенным вариантам осуществления Форма А характеризуется анализом динамической сорбции паров. Характерный график изотермы

динамической сорбции паров (DVS) показан на фиг. 6 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления, когда относительная влажность («RH») увеличивается от приблизительно 0% до приблизительно 90% RH, Форма А демонстрирует поглощение воды менее 1,5%, менее 1,2% или приблизительно 1,2% масс./масс. Согласно определенным вариантам осуществления Форма А содержит менее 0,1% воды, как определено в кулонометрическом титраторе Карла Фишера (KF), оборудованном печью для обработки образцов, установленной при 225 °C.

[00374] Согласно определенным вариантам осуществления не наблюдается значительного разложения или остаточного растворителя для формы А согласно ¹H ЯМР (см. фиг. 7 публикации США № 2019/0030018).

[00375] Согласно определенным вариантам осуществления Форма А Соединения D характеризуется ее профилем стабильности при сжатии. Согласно определенным вариантам осуществления Форма А является стабильной, например, ее картина XRPD остается практически неизменной с более широкими дифракционными пиками при приложении давления 2000 пси в течение приблизительно 1 минуты (см. фиг. 8 публикации США № 2019/0030018).

[00376] Согласно другому варианту осуществления Форма А Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистая Форма А Соединения D по существу свободна от других твердых форм, например, аморфной формы. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистой Формы А Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00377] Согласно определенным вариантам осуществления Форма А Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения Форма А Соединения D по существу свободна от других твердых форм, содержащих Соединение D, включая, например, Формы В, С, D, Е и/или аморфную твердую форму, содержащую Соединение D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма А представляет собой смесь твердых форм, содержащих Соединение D,

включая, например, смесь, содержащую одно или несколько из следующего: Формы В, С, D, E и аморфная твердая форма, содержащая Соединение D.

[00378] Форма В 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизониндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00379] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, получены из безводной Формы В Соединения D.

[00380] Согласно определенным вариантам осуществления Форму В получают перекристаллизацией в антирастворителе из определенных систем растворителей, например, систем растворителей, содержащих один или несколько из следующих растворителей: метанол/вода, DMSO/изопропанол, DMSO/толуол и DMSO/вода. Согласно определенным вариантам осуществления Форму В получают перекристаллизацией с охлаждением из ТГФ/воды (1:1).

[00381] Согласно определенным вариантам осуществления Форма В является кристаллической, как указано посредством, например, измерения рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно одному варианту осуществления Форма В Соединения D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 9 публикации США № 2019/0030018.

[00382] Согласно одному варианту осуществления Форма В Соединения D имеет один или несколько характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 15,4, 16,3, 16,7, 17,7, 20,4, 25,6 или 27,5, градусов 2θ , как показано на фиг. 9 публикации США № 2019/0030018. Согласно другому варианту осуществления Форма В Соединения D имеет один, два, три или четыре характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 16,7, 25,6, 15,4 или 16,3 градусов 2θ . Согласно другому варианту осуществления Форма В Соединения D имеет один, два, три, четыре, пять, шесть или семь характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице В. Согласно другому варианту осуществления Форма В Соединения D имеет один, два или три характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице В.

Таблица В

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
1	7,01	12,6035	9,3
2	11,58	7,6444	8,3
3	11,80	7,5027	6,8
4	12,73	6,9551	18,4
5	15,38	5,7601	34,8
6	16,32	5,4330	31,4
7	16,72	5,3012	100,0
8	17,72	5,0046	26,6
9	18,13	4,8930	19,8
10	18,77	4,7271	7,5
11	20,41	4,3516	22,0
12	21,02	4,2258	15,9
13	21,21	4,1881	13,5
14	21,93	4,0529	3,4
15	23,68	3,7581	14,2
16	25,01	3,5601	10,4
17	25,63	3,4755	37,3
18	26,19	3,4030	9,8
19	26,73	3,3349	8,5
20	27,45	3,2499	20,9
21	27,71	3,2193	9,4
22	28,22	3,1623	11,8
23	29,48	3,0296	4,7
24	30,10	2,9692	15,0
25	31,08	2,8775	18,3
26	31,65	2,8272	6,2
27	34,29	2,6150	3,4

[00383] Согласно одному варианту осуществления Форма В Соединения D имеет изображение SEM, как изложено на фиг. 10 публикации США № 2019/0030018. Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма Соединения D имеет термогравиметрическую (TGA) термограмму, по существу соответствующую репрезентативной термограмме TGA, как показано на фиг. 11 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В не показывает потери массы TGA ниже 170 °C. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В показывает потерю массы TGA на 0,4% в диапазоне 170~230 °C.

[00384] Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма В Соединения D имеет термограмму DSC, в основном соответствующую как показано на фиг. 12 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В характеризуется графиком DSC, включающим событие плавления/перекристаллизации при 219~224°C и основное событие плавления с пиковой температурой 231°C.

[00385] Согласно определенным вариантам осуществления Форма В характеризуется анализом динамической сорбции паров. Характерный график изотермы динамической сорбции паров (DVS) показан на фиг. 13 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления, когда относительная влажность («RH») увеличивается от приблизительно 0% до приблизительно 90% RH, Форма В демонстрирует поглощение воды приблизительно 1,4% масс./масс. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В содержит менее 0,1% воды, как определено в кулонометрическом титраторе Карла Фишера (KF), оборудованном печью для обработки образцов, установленной при 225 °C.

[00386] Согласно определенным вариантам осуществления не наблюдается значительного разложения или остаточного растворителя для формы В согласно ¹H ЯМР (см. фиг. 14 публикации США № 2019/0030018).

[00387] Согласно определенным вариантам осуществления Форма В Соединения D характеризуется ее профилем стабильности при сжатии. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В является стабильной, например, ее картина XRPD остается практически неизменной с более широкими дифракционными пиками при приложении давления 2000 пси в течение приблизительно 1 минуты (см. фиг. 15 публикации США № 2019/0030018).

[00388] Согласно другому варианту осуществления Форма В Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистая Форма В Соединения D по существу свободна от других твердых форм, *например*, аморфной формы. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистой Формы В Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00389] Согласно определенным вариантам осуществления Форма В Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В Соединения D по существу свободна от других твердых форм, содержащих Соединение D, включая, *например*, Формы А, С, D, Е, и/или аморфную твердую форму, содержащую Соединение D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма В представляет собой смесь твердых форм, содержащих Соединение D, включая, *например*, смесь, содержащую одно или несколько из следующего: Формы А, С, D, Е и аморфная твердая форма, содержащая Соединение D.

[00390] **Форма С 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида**

[00391] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, получают из безводной Формы С Соединения D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С является наиболее термодинамически стабильным ангидратом среди кристаллических форм Соединения D.

[00392] Согласно определенным вариантам осуществления Форму С получают суспендированием Соединения D в определенных системах растворителей, *например*, системах растворителей, содержащих один или несколько из следующих растворителей: ацетонитрил/вода, ацетон или этанол/вода в течение длительного периода времени.

[00393] Согласно определенным аспектам Форму С получают суспендированием Формы В (1X мас.) в ацетоне (30X об.) при повышенной температуре, *например*, от 60-80°C или 70-75°C в течение по меньшей мере 24 часов, и охлаждением смеси до комнатной температуры. Согласно одному аспекту суспендирование проводят при температуре 70-75°C

под давлением азота 50-55 пси. Согласно одному аспекту смесь охлаждают до комнатной температуры в течение по меньшей мере 6 часов.

[00394] Согласно определенным вариантам осуществления Форма С является кристаллической, как указано посредством, например, измерения рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно одному варианту осуществления Форма С Соединения D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 16 публикации США № 2019/0030018.

[00395] Согласно одному варианту осуществления Форма С Соединения D имеет один или несколько характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 7,4, 11,5, 15,8, 16,7, 16,9, 17,7, 18,4, 19,2, 19,5, 21,1, 23,4, 24,7 или 29,9, градусов 2θ , как показано на фиг. 16 публикации США № 2019/0030018. Согласно другому варианту осуществления Форма С Соединения D имеет один, два, три или четыре характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 16,7, 16,9, 17,7 или 24,7 градусов 2θ . Согласно другому варианту осуществления Форма С Соединения D имеет один, два, три, четыре, пять, шесть или семь характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице С. Согласно другому варианту осуществления Форма С Соединения D имеет один, два или три характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице С.

Таблица С

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
1	7,36	12,0091	32,0
2	9,14	9,6750	8,3
3	11,51	7,6855	44,7
4	12,22	7,2420	4,9
5	15,17	5,8398	8,4
6	15,82	5,6011	31,8
7	16,68	5,3140	57,1
8	16,92	5,2392	86,8
9	17,72	5,0057	100,0
10	18,39	4,8242	21,9

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
11	19,18	4,6268	36,4
12	19,45	4,5649	27,1
13	21,11	4,2077	40,4
14	21,82	4,0724	12,4
15	22,28	3,9902	12,0
16	22,57	3,9398	17,6
17	23,36	3,8082	24,7
18	24,26	3,6695	7,1
19	24,71	3,6026	72,5
20	25,74	3,4615	16,9
21	26,03	3,4231	9,7
22	26,51	3,3627	17,7
23	27,88	3,1998	18,0
24	28,70	3,1104	6,9
25	29,91	2,9871	30,5
26	30,43	2,9375	10,7
27	30,83	2,9006	5,8
28	32,01	2,7960	16,6
29	37,94	2,3718	5,5

[00396] Согласно одному варианту осуществления Форма С Соединения D имеет изображение SEM, как изложено на фиг. 17 публикации США № 2019/0030018. Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма Соединения D имеет термогравиметрическую (TGA) термограмму, по существу соответствующую репрезентативной термограмме, как показано на фиг. 18 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С не показывает потерю массы TGA.

[00397] Согласно одному варианту осуществления кристаллическая форма С Соединения D имеет термограмму DSC, соответствующую по существу как показано на фиг. 19 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления

Форма С характеризуется графиком DSC, включающим плавление с начальной температурой 232 °С и теплотой плавления 126 Дж/г.

[00398] Согласно определенным вариантам осуществления Форма С характеризуется анализом динамической сорбции паров. Характерный график изотермы динамической сорбции паров (DVS) показан на фиг. 20 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления, когда относительная влажность («RH») увеличивается от приблизительно 0% до приблизительно 90% RH, Форма В демонстрирует поглощение воды приблизительно 0,6% масс./масс. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С содержит менее 0,1% воды, как определено в кулонометрическом титраторе Карла Фишера (KF), оборудованном печью для обработки образцов, установленной при 225 °С.

[00399] Согласно определенным вариантам осуществления не наблюдается значительного разложения или остаточного растворителя для формы С согласно ¹H ЯМР (см. фиг. 21 публикации США № 2019/0030018).

[00400] Согласно определенным вариантам осуществления Форма С Соединения D характеризуется ее профилем стабильности при сжатии. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С является стабильной, например, ее картина XRPD остается практически неизменной с более широкими дифракционными пиками при приложении давления 2000 пси в течение приблизительно 1 минуты (см. фиг. 22 публикации США № 2019/0030018).

[00401] Согласно другому варианту осуществления Форма С Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистая Форма С Соединения D по существу свободна от других твердых форм, *например*, аморфной формы. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистой Формы С Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00402] Согласно определенным вариантам осуществления Форма С Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С Соединения D по существу свободна от других твердых форм, содержащих Соединение D

включая, например, Формы А, В, D, Е, и/или аморфную твердую форму, содержащую Соединение D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма С представляет собой смесь твердых форм, содержащих Соединение D, включая, например, смесь, содержащую одно или несколько из следующего: Формы А, В, D, Е и аморфную твердую форму, содержащую Соединение D.

[00403] Форма D 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизондолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00404] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, получены из Формы D Соединения D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма D Соединения D представляет собой сольват DMSO.

[00405] Согласно определенным вариантам осуществления Форму D получают нагреванием Формы В в смеси DMSO/метилизобутилкетон и охлаждением раствора.

[00406] Согласно определенным вариантам осуществления Форма D является кристаллической, как указано посредством, например, измерения рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно одному варианту осуществления Форма D Соединения D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 23 публикации США № 2019/0030018.

[00407] Согласно одному варианту осуществления Форма D Соединения D имеет один или несколько характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 14,1, 14,3, 18,8, 19,1, 23,6 или 24,0 градусов 2θ , как показано на фиг. 23 публикации США № 2019/0030018. Согласно другому варианту осуществления Форма D Соединения D имеет один, два, три или четыре характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 14,1, 14,3, 18,8 или 19,1 градусов 2θ . Согласно другому варианту осуществления Форма D Соединения D имеет один, два, три, четыре, пять, шесть или семь характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице D. Согласно другому варианту осуществления Форма D Соединения D имеет один, два или три характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице D.

Таблица D

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
1	4,77	18,5435	3,0
2	9,57	9,2399	7,0
3	10,55	8,3876	3,1
4	11,95	7,4070	3,7
5	12,50	7,0808	3,5
6	14,06	6,2990	100,0
7	14,30	6,1927	92,9
8	16,13	5,4943	3,8
9	17,02	5,2097	8,4
10	17,50	5,0676	19,8
11	17,78	4,9881	8,0
12	18,09	4,9049	7,7
13	18,27	4,8561	9,0
14	18,75	4,7326	58,5
15	19,09	4,6482	63,5
16	21,04	4,2228	7,3
17	22,77	3,9053	10,9
18	23,58	3,7738	53,6
19	24,02	3,7045	24,6
20	24,90	3,5756	8,4
21	25,22	3,5310	10,0
22	26,37	3,3796	9,4
23	26,63	3,3470	7,9
24	28,21	3,1640	5,8
25	29,82	2,9958	3,0
26	30,16	2,9629	5,0
27	30,45	2,9361	6,7
28	32,48	2,7566	3,3

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
29	33,03	2,7120	8,1
30	33,69	2,6604	3,4
31	35,32	2,5413	3,0
32	37,96	2,3702	3,2
33	38,70	2,3269	3,0

[00408] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к кристаллической форме Соединения D, имеющей термогравиметрическую (TGA) термограмму, по существу соответствующую репрезентативной термограмме TGA, как показано на фиг. 24 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам осуществления Форма D имеет потерю массы TGA приблизительно 14,1 % до 140 °C.

[00409] Согласно определенным вариантам осуществления Форма D содержит DMSO в количестве приблизительно 14,3 масс.%, как измерено с помощью газовой хроматографии.

[00410] Согласно другому варианту осуществления Форма D Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистая Форма D Соединения D по существу свободна от других твердых форм, например, аморфной формы. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистой Формы D Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00411] Согласно определенным вариантам осуществления Форма D Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления Форма D Соединения D по существу свободна от других твердых форм, содержащих Соединение D, включая, например, Формы A, B, C, E, и/или аморфную твердую форму, содержащую Соединение D, как раскрыто в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления Форма D представляет собой смесь твердых форм, содержащих Соединение D,

включая, например, смесь, содержащую одно или несколько из следующего: Формы А, В, С, Е и аморфную твердую форму, содержащую Соединение D.

[00412] Форма Е 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизониндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00413] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, получены из Формы Е Соединения D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма Е Соединения D представляет собой сольват DMSO.

[00414] Согласно определенным вариантам осуществления Форму Е получают из Формы С в DMSO/MIBK или DMSO/IPA, или DMSO/анизоле при комнатной температуре.

[00415] Согласно определенным вариантам осуществления Форма Е является кристаллической, как указано посредством, например, измерения рентгеновской порошковой дифрактометрии. Согласно одному варианту осуществления Форма Е Соединения D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 25 публикации США № 2019/0030018.

[00416] Согласно одному варианту осуществления Форма Е Соединения D имеет один или несколько характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 10,5, 12,5, 16,1, 17,0, 18,5, 21,2, 21,7, 22,6, 22,9, 23,4, 23,8, 24,1, 25,1 или 26,7, градусов 2 θ , как показано на фиг. 25 публикации США № 2019/0030018. Согласно другому варианту осуществления Форма Е Соединения D имеет один, два, три или четыре характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии при 2-тета угле приблизительно 16,1, 17,0, 21,2 или 22,9 градусов 2 θ . Согласно другому варианту осуществления Форма Е Соединения D имеет один, два, три, четыре, пять, шесть или семь характерных пиков рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице Е. Согласно другому варианту осуществления Форма Е Соединения D имеет один, два или три характерных пика рентгеновской порошковой дифрактометрии, как изложено в Таблице Е.

Таблица Е

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
1	4,20	21,0329	9,6
2	10,48	8,4394	32,0

№	Положение [°2Th.]	d-расстояние [Å]	Относительная интенсивность [%]
3	12,54	7,0591	28,4
4	14,52	6,1023	9,9
5	15,51	5,7131	17,7
6	16,08	5,5121	100,0
7	16,97	5,2256	94,5
8	17,77	4,9908	17,1
9	18,48	4,8001	20,5
10	19,54	4,5422	14,7
11	21,15	4,2007	62,8
12	21,72	4,0924	20,8
13	22,64	3,9270	57,4
14	22,91	3,8826	59,9
15	23,43	3,7977	23,6
16	23,83	3,7348	23,2
17	24,13	3,6881	29,5
18	25,14	3,5421	35,2
19	26,72	3,3362	49,5
20	27,68	3,2232	14,6
21	27,93	3,1949	15,3
22	28,86	3,0942	15,6
23	29,08	3,0703	18,3
24	30,12	2,9671	7,1
25	30,92	2,8923	12,8
26	32,35	2,7672	5,0
27	33,21	2,6979	6,9

[00417] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к кристаллической форме Соединения D, имеющей термогравиметрическую (TGA) термограмму, по существу соответствующую репрезентативной термограмме TGA, как показано на фиг. 26 публикации США № 2019/0030018. Согласно определенным вариантам

осуществления Форма Е имеет потерю массы TGA приблизительно 19,4 % до 120 °С. Согласно определенным вариантам осуществления Форма Е показывает дополнительную потерю массы 24,9 % в диапазоне 120 - 220 °С.

[00418] Согласно одному варианту осуществления Форма Е Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистая Форма Е Соединения D по существу свободна от других твердых форм, например, аморфной формы. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистой Формы Е Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00419] Согласно определенным вариантам осуществления Форма Е Соединения D является по существу чистой. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, Форма Е Соединения D по существу свободна от других твердых форм, содержащих Соединение D, включая, например, Формы А, В, С, D и/или аморфную твердую форму, содержащую Соединение D. Согласно определенным вариантам осуществления Форма Е представляет собой смесь твердых форм, содержащих Соединение D, включая, например, смесь, содержащую одно или несколько из следующего: Формы А, В, С, D и аморфная твердая форма, содержащая Соединение D.

[00420] Аморфная форма 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00421] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, содержат аморфное Соединение D.

[00422] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам получения аморфной формы путем нагревания Соединения D в ТГФ и воде и охлаждения раствора.

[00423] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к аморфной твердой форме Соединения D, имеющей модулированную термограмму DSC, как показано на фиг. 27 публикации США № 2019/0030018.

[00424] Согласно одному варианту осуществления аморфное Соединение D имеет модель рентгеновской порошковой дифрактометрии, по существу как показано на фиг. 28 публикации США № 2019/0030018.

[00425] Согласно одному варианту осуществления аморфное Соединение D имеет спектр ^1H ЯМР, по существу как показано на фиг. 29 публикации США № 2019/0030018.

[00426] Согласно другому варианту осуществления аморфное Соединение D является по существу чистым. Согласно определенным вариантам осуществления по существу чистое аморфное Соединение D по существу свободно от других твердых форм, например, Формы А, Формы В, Формы С, Формы D или Формы Е. Согласно определенным вариантам осуществления чистота по существу чистого аморфного Соединения D составляет не менее приблизительно 95% чистоты, не менее приблизительно 96% чистоты, не менее приблизительно 97% чистоты, не менее приблизительно 98% чистоты, не менее приблизительно 98,5% чистоты, не менее приблизительно 99% чистоты, не менее приблизительно 99,5% чистоты или не менее приблизительно 99,8% чистоты.

[00427] Изотопологи 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида

[00428] Настоящее изобретение также относится к изотопически обогащенным аналогам 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида («изотопологам»), раскрытым в настоящем документе. Обогащение изотопами (например, дейтерирование) фармацевтических препаратов для улучшения фармакокинетики («РК»), фармакодинамики («PD») и профилей токсичности ранее было продемонстрировано для некоторых классов препаратов. См., например, Lijinsky *et. al.*, *Food Cosmet. Toxicol.*, 20: 393 (1982), Lijinsky *et. al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, 69: 1127 (1982), Mangold *et. al.*, *Mutation Res.* 308: 33 (1994), Gordon *et. al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 15: 589 (1987), Zello *et. al.*, *Metabolism*, 43: 487 (1994), Gately *et. al.*, *J. Nucl. Med.*, 27: 388 (1986), Wade D, *Chem. Biol. Interact.* 117: 191 (1999).

[00429] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, изотопное обогащение лекарственного средства можно применять, например, для (1) уменьшения или устранения нежелательных метаболитов, (2) увеличения периода полувыведения исходного лекарственного средства, (3) уменьшения числа доз, необходимых для достижения желаемого эффекта, (4) уменьшения размера дозы, необходимого для достижения желаемого эффекта, (5)

увеличения образования активных метаболитов, если таковые образуются, и/или (б) уменьшения продукции вредных метаболитов в конкретных тканях и/или создания более эффективного лекарственного средства и/или более безопасного лекарственного средства для комбинированной терапии, является ли комбинированная терапия преднамеренной или нет.

[00430] Замена атома одним из его изотопов часто приводит к изменению скорости химической реакции. Это явление известно как кинетический изотопный эффект («КИЕ»). Например, если связь С–Н разрывается на определяющей скорости стадии химической реакции (т.е. на стадии с наибольшей энергией переходного состояния), замена этого водорода на дейтерий вызовет снижение скорости реакции и процесс будет замедляться. Это явление известно, как кинетический изотопный эффект дейтерия («DKIE»). (См., например, Foster *et al.*, Adv. Drug Res., vol. 14, pp. 1-36 (1985), Kushner *et al.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., vol. 77, pp. 79-88 (1999)).

[00431] Величина DKIE может быть выражена как отношение скоростей данной реакции, в которой разрывается связь С–Н, и той же реакции, в которой водород заменяется дейтерием. DKIE может варьироваться от приблизительно 1 (отсутствие изотопного эффекта) до очень больших чисел, таких как 50 или более, что означает, что реакция может быть в пятьдесят или более раз медленнее, когда водород замещается дейтерием. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, высокие значения DKIE могут быть частично обусловлены явлением, известным как туннелирование, которое является следствием принципа неопределенности. Туннелирование приписывается небольшой массе атома водорода и происходит потому, что переходные состояния с участием протона иногда могут образовываться в отсутствие необходимой энергии активации. Поскольку дейтерий имеет большую массу, чем водород, статистически вероятность того, что он подвергнется этому явлению, гораздо ниже.

[00432] Тритий («Т») представляет собой радиоактивный изотоп водорода, используемый в исследованиях, термоядерных реакторах, генераторах нейтронов и радиофармацевтических средствах. Тритий представляет собой атом водорода, который имеет 2 нейтрона в ядре и имеет атомный вес, близкий к 3. Он встречается в природе в очень низких концентрациях, чаще всего встречается в виде Т2О. Тритий медленно распадается (период полураспада = 12,3 лет) и испускает бета-частицы с низкой энергией, которые не могут проникнуть через внешний слой кожи человека. Внутреннее воздействие является основной опасностью, связанной с этим изотопом, однако, его необходимо принимать внутрь в больших

количествах, чтобы он оказал значительный риск для здоровья. По сравнению с дейтерием необходимо потреблять меньшее количество трития, прежде чем он достигнет опасного уровня. Замена водорода на тритий («Т») приводит к еще более прочной связи, чем дейтерий, и дает численно большие изотопные эффекты.

[00433] Подобным образом, замещение изотопов для других элементов, включая без ограничения ^{13}C или ^{14}C для углерода, ^{33}S , ^{34}S или ^{36}S для серы, ^{15}N для азота, и ^{17}O или ^{18}O для кислорода, обеспечит подобные кинетические изотопные эффекты.

[00434] Согласно определенным вариантам осуществления соединение, раскрытое в настоящем документе, представляет собой пролекарство соединения, раскрытого в настоящем документе (например, пролекарство Соединения D). Иллюстративные соединения включают раскрытые в публикации США № 2017/0197933, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

5.6. Фармацевтические композиции

[00435] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение, раскрытое в настоящем документе, составлено в фармацевтическую композицию. Согласно некоторым вариантам осуществления Соединение D представлено в виде стабильных составов Соединения D. Согласно одному варианту осуществления составы Соединения D содержат твердую форму 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида. Согласно одному варианту осуществления составы Соединения D содержат аморфную форму 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида.

[00436] Согласно определенным вариантам осуществления составы получены с диметилсульфоксидом в качестве сорастворителя или вспомогательного вещества для обработки. Согласно определенным вариантам осуществления составы получены с муравьиной кислотой в качестве сорастворителя или вспомогательного вещества для обработки. Согласно определенным вариантам осуществления составы получены без какого-либо сорастворителя или вспомогательного вещества для обработки.

[00437] Согласно определенным вариантам осуществления составы содержат диметилсульфоксид в качестве сорастворителя или вспомогательного вещества для обработки. Согласно определенным вариантам осуществления составы содержат муравьиную кислоту в качестве сорастворителя или вспомогательного вещества для обработки. Согласно

определенным вариантам осуществления составы не содержат какой-либо соразтворитель или вспомогательное вещество для обработки.

[00438] Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, представляют собой лиофилизированные составы. Согласно определенным вариантам осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, представляют собой восстановленные составы, полученные в фармацевтически приемлемом растворителе, с получением фармацевтически приемлемого раствора.

[00439] Состав Ia

[00440] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6% и гидроксипропил β -циклодекстрин (HPBCD) в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы состава.

[00441] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы состава.

[00442] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6%, HPBCD в количестве приблизительно 92-98% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00443] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6%, сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 92-98% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00444] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6% и HPBCD в количестве приблизительно 94-96% на основе общей массы состава.

[00445] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%,

цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 94-96% на основе общей массы состава.

[00446] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6%, HPBCD в количестве приблизительно 94-96% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00447] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6%, сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 94-96% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00448] Согласно одному аспекту, состав, раскрытый в настоящем документе, содержит Соединение D в количестве приблизительно 0,08 до приблизительно 0,15% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет от приблизительно 0,09% до приблизительно 0,15 %, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,13% или от приблизительно 0,11% до приблизительно 0,12% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,11%, 0,12%, 0,13% или 0,15% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество Соединения D в составе составляет приблизительно 0,12% на основе общей массы состава.

[00449] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1,5 мг, от приблизительно 0,75 мг до приблизительно 1,25 мг или от приблизительно 0,8 мг до приблизительно 1,1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 0,7, 0,75, 0,76, 0,8, 0,9, 1,0, 1,05 или 1,2 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 1,05 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00450] Согласно одному аспекту составы, раскрытые в настоящем документе, содержат цитратный буфер. Согласно одному аспекту, количество цитратного буфера в

составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 3% до приблизительно 6% на основе общей массы состава. Согласно одному аспекту, количество цитратного буфера в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 3%, 3,5%, 4%, 4,2%, 4,5% или 5% на основе общей массы состава. Согласно одному аспекту, количество цитратного буфера в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 4,2 % на основе общей массы состава. Согласно одному аспекту, количество цитратного буфера в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 37 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00451] Согласно одному варианту осуществления цитратный буфер содержит безводную лимонную кислоту и безводный цитрат натрия. Согласно определенным вариантам осуществления количество безводной лимонной кислоты составляет от приблизительно 1,5% до приблизительно 3%, от приблизительно 1,75% до приблизительно 2,75% или от приблизительно 2% до приблизительно 2,5% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество безводной лимонной кислоты в составе составляет приблизительно 1,5%, 1,75%, 2%, 2,1% или 2,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество безводной лимонной кислоты в составе составляет приблизительно 2%, 2,1%, 2,22% или 2,3% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество безводной лимонной кислоты в составе составляет приблизительно 2,10% на основе общей массы состава.

[00452] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит безводную лимонную кислоту в количестве от приблизительно 16 мг до приблизительно 20 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному варианту осуществления количество безводной лимонной кислоты составляет приблизительно 16, 17, 18, 18,2, 18,4, 18,6, 18,8, 19 или 20 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному варианту осуществления количество безводной лимонной кислоты составляет приблизительно 18,6 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00453] Согласно определенным вариантам осуществления количество безводного цитрата натрия составляет от приблизительно 1,5% до приблизительно 3%, от приблизительно 1,75% до приблизительно 2,75% или от приблизительно 2% до приблизительно 2,5% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество безводного цитрата натрия в составе составляет приблизительно 1,5%, 1,75%, 2%, 2,1% или 2,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту

осуществления количество безводного цитрата натрия в составе составляет приблизительно 2%, 2,05%, 2,08% или 2,1% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество безводного цитрата натрия в составе составляет приблизительно 2,08% на основе общей массы состава.

[00454] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит безводный цитрат натрия в количестве от приблизительно 16 мг до приблизительно 20 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному варианту осуществления количество безводного цитрата натрия составляет приблизительно 16, 17, 18, 18,2, 18,4, 18,6, 18,8, 19 или 20 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному варианту осуществления количество безводного цитрата натрия составляет приблизительно 18,4 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00455] Согласно определенным вариантам осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 94 до приблизительно 97% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 94,5%, 95%, 95,5% или 96% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 95% на основе общей массы состава.

[00456] Согласно определенным вариантам осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 94 до приблизительно 97% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 94,5%, 95%, 95,5% или 96% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 95% на основе общей массы состава.

[00457] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 800 - 900 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 810 - 880 мг, 820 - 860 мг или 830 - 850 мг в сосуде,

объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBСD в количестве приблизительно 840 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00458] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 800 - 900 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 810 - 880 мг, 820 - 860 мг или 830 - 850 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 840 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00459] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Kleptose®HPB в количестве приблизительно 840 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00460] Согласно одному варианту осуществления составы содержат диметилсульфоксид в количестве не более приблизительно 1,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат диметилсульфоксид в количестве до 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат не более приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат диметилсульфоксид в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество диметилсульфоксида в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,3% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество диметилсульфоксида в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9% или 1% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, не содержат диметилсульфоксид. Согласно одному варианту осуществления количество диметилсульфоксида в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно от 0,4% до 0,8% на основе общей массы состава.

[00461] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит диметилсульфоксид в количестве приблизительно от 4 до 7 мг в сосуде,

объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит диметилсульфоксид в количестве приблизительно 4,5 - 6,5 мг или 5 - 6 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00462] Согласно определенным вариантам осуществления состав, раскрытый в настоящем документе, является лиофилизированным, и лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 4 - 5. Согласно определенным вариантам осуществления состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 4,2 - 4,4. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5.

[00463] Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 250-290 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 260-280 мОсм/кг.

[00464] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к контейнеру, содержащему состав, раскрытый в настоящем документе. Согласно одному аспекту контейнером является стеклянный сосуд. Согласно одному аспекту контейнером является стеклянный сосуд, объемом 20 куб.см.

[00465] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, которое включает наполнитель, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 7 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит не более приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит не более приблизительно 5 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит не более приблизительно 4 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит от приблизительно 3 мг до приблизительно 7 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 6 мг, от приблизительно 4 мг до приблизительно 5 мг или от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг

диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит приблизительно 4, 4,5, 5, 5,3, 5,5, 5,7, 6 или 6,5 мг диметилсульфоксид в качестве остаточного растворителя.

[00466] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратного буфера в количестве приблизительно 3%-6% и HPBCD в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы состава.

[00467] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратного буфера в количестве приблизительно 3%-6% и сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы состава.

[00468] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратного буфера в количестве приблизительно 3%-6%, HPBCD в количестве приблизительно 92-98% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00469] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,05-0,2%, цитратного буфера в количестве приблизительно 3%-6%, сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 92-98% и не более приблизительно 1% диметилсульфоксида на основе общей массы состава.

[00470] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество, которое включает буфер и наполнитель, как описано в настоящем документе, и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя. Буфер и наполнитель могут присутствовать в количестве, как описано в настоящем документе.

[00471] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое

обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 3,8 мл стерильной воды для инъекции.

[00472] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит по существу из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 3,8 мл стерильной воды для инъекции.

[00473] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 3,8 мл стерильной воды для инъекции.

[00474] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, содержащему Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,2% на основе общей массы твердых веществ, цитратный буфер в количестве приблизительно 3%-6% на основе общей массы твердых веществ, HPBCD в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы твердых веществ и разбавитель.

[00475] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, состоящему по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,05-0,2% на основе общей массы твердых веществ, цитратного буфера в количестве приблизительно 3%-6% на основе общей массы твердых веществ, HPBCD в количестве приблизительно 92-98% на основе общей массы твердых веществ и разбавителя.

[00476] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя и приблизительно 3,8 мл разбавителя.

[00477] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу который состоит по существу из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя и приблизительно 3,8 мл разбавителя.

[00478] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1,05 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 18,6 мг безводной лимонной кислоты, 18,4 мг безводного цитрата натрия, 840 мг HPBCD и от приблизительно 5 мг до приблизительно 6 мг диметилсульфоксида в качестве остаточного растворителя и приблизительно 3,8 мл разбавителя.

[00479] Состав Ib

[00480] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,01-0,15%, гидроксипропил β-циклодекстрин в количестве приблизительно 99,1-99,99%. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,01-0,15%, гидроксипропил β-циклодекстрин в количестве приблизительно 99,1-99,99% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00481] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25% и HPBCD в количестве приблизительно 99,1-99,9% на основе общей массы состава.

[00482] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25%,

HPBCD в количестве приблизительно 99,1-99,9% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00483] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25% и HPBCD в количестве приблизительно 99,75-99,9% на основе общей массы состава.

[00484] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25%, HPBCD в количестве приблизительно 99,75-99,9% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00485] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25%, HPBCD в количестве приблизительно 99,75-99,9% и не более приблизительно 0,2% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00486] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15% и HPBCD в количестве приблизительно 99,8-99,9% на основе общей массы состава.

[00487] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, HPBCD в количестве приблизительно 99,8-99,9% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00488] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, HPBCD в количестве приблизительно 99,8-99,9% и не более приблизительно 0,12% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00489] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,12% и HPBCD в количестве приблизительно 99,88% на основе общей массы состава.

[00490] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,1-99,9%, на основе общей массы состава.

[00491] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25%, сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,1-99,9% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00492] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,05-0,25% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,75-99,9% на основе общей массы состава.

[00493] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,8-99,9% на основе общей массы состава.

[00494] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,08-0,15%, сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,8-99,9% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00495] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,12% и сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 99,88% на основе общей массы состава.

[00496] Согласно одному аспекту, состав, раскрытый в настоящем документе, содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,08 до приблизительно 0,15% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет от приблизительно 0,09% до приблизительно 0,15 %, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,13% или от приблизительно 0,11% до приблизительно 0,12% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, или 0,15% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество Соединения D в составе составляет приблизительно 0,12% на основе общей массы состава.

[00497] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2

мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1,5 мг, от приблизительно 0,75 мг до приблизительно 1,25 мг или от приблизительно 0,8 мг до приблизительно 1,1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 0,7, 0,75, 0,76, 0,8, 0,9, 1,0, 1,05 или 1,2 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00498] Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 97% до приблизительно 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 98% до приблизительно 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 99,1%, 99,3%, 99,5%, 99,7% или 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 99,5% на основе общей массы состава. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 750-850 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 790 - 840 мг, 780 - 830 мг или 790 - 810 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 800 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00499] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Kleptose HPB в количестве приблизительно 800 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00500] Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 97 до приблизительно 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 98 до приблизительно 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах,

раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 99,1%, 99,3%, 99,5%, 99,7% или 99,9% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 99,5% на основе общей массы состава.

[00501] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 750 - 850 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 790 - 840 мг, 780 - 830 мг или 790 - 810 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина в количестве приблизительно 800 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00502] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Kleptose HPB в количестве приблизительно 800 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00503] Согласно одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве до приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, не содержат муравьиную кислоту. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной

кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно от 0,05% до 0,09% на основе общей массы состава.

[00504] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве до приблизительно 0,2, 0,5, 0,7, 0,9 мг или 1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве приблизительно 0,3-0,9 мг или от 0,4 до 0,8 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00505] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве приблизительно 1 мг и HPBCD в количестве приблизительно 800 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00506] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве приблизительно 1 мг, HPBCD в количестве приблизительно 800 мг и муравьиную кислоту в количестве приблизительно 0,9 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00507] Состав Ic

[00508] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,01 до 0,08% и HPBCD в количестве приблизительно 99,40-99,99% на основе общей массы состава.

[00509] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,01 до 0,08%, HPBCD в количестве приблизительно 99,40 - 99,99% и не более приблизительно 0,5% муравьиной кислоты на основе общей массы состава.

[00510] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,03 - 0,06% и HPBCD в количестве приблизительно 99,60 - 99,99% на основе общей массы состава.

[00511] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,08%, гидроксипропил β -циклодекстрин от приблизительно 99,40% до приблизительно 99,99%

и муравьиную кислоту от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,3% на основе общей массы состава

[00512] Согласно одному аспекту, состав, раскрытый в настоящем документе, содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,06% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,06 % или от приблизительно 0,04% до приблизительно 0,06% на основе общей массы состава. Согласно определенным вариантам осуществления количество Соединения D составляет приблизительно 0,03%, 0,04%, 0,05% или 0,06% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество Соединения D в составе составляет приблизительно 0,05% на основе общей массы состава.

[00513] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,75 мг до приблизительно 1,5 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве от приблизительно 0,75 мг до приблизительно 1,25 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 0,75, 0,8, 0,9, 1,0, 1,05 или 1,2 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно одному аспекту Соединение D присутствует в количестве приблизительно 1 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00514] Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 99,40 до приблизительно 99,99 % на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество HPBCD в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 99,95 или 99,99% на основе общей массы состава. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 1800-1900 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 1850 - 1900 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит HPBCD в количестве приблизительно 1875 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00515] Согласно одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 0,5% на основе общей массы состава. Согласно

одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве до приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы содержат муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,3% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,25% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно 0,05%, 0,07%, 0,09%, 0,1%, 0,2% или 0,3% на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, не содержат муравьиную кислоту. Согласно одному варианту осуществления количество муравьиной кислоты в составах, раскрытых в настоящем документе, составляет приблизительно от 0,11% до 0,3% на основе общей массы состава.

[00516] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве не более приблизительно 4 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве до приблизительно 1, 1,8, 2, 2,1, 2,5, 3, 3,5, 3,8, 3,9, 4, 4,5, 4,9 мг или 5 мг в сосуде, объемом 20 куб. см. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к составу, который содержит муравьиную кислоту в количестве приблизительно 1 - 1,8 мг, 2,1- 3,8 мг или 3,9 - 4,9 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00517] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве приблизительно 1 мг и HPBCD в количестве приблизительно 1875 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00518] Согласно другому аспекту, настоящее изобретение относится к составу, который содержит Соединение D в количестве приблизительно 1 мг, HPBCD в количестве приблизительно 1875 мг и муравьиную кислоту в количестве приблизительно 2,1 - 3,8 мг в сосуде, объемом 20 куб. см.

[00519] Составы без сорастворителя

[00520] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,15 - 0,5%, цитратный буфер в количестве от приблизительно 15% до приблизительно 35% и HPBCD в количестве от приблизительно 92% до приблизительно 98%, на основе общей массы состава. Согласно одному варианту осуществления цитратный буфер содержит безводную лимонную кислоту и безводный цитрат натрия.

[00521] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,25 - 0,30%, цитратный буфер в количестве приблизительно 30 - 32% и HPBCD в количестве приблизительно 67 - 69%, на основе общей массы состава.

[00522] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, содержащим Соединение D в количестве приблизительно 0,30- 0,33%, цитратный буфер в количестве приблизительно от 17 до 18% и HPBCD в количестве приблизительно 80 - 85%, на основе общей массы состава.

[00523] Иллюстративные составы

[00524] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно от 0,05 до 0,25% и HPBCD в количестве приблизительно от 99,75 до 99,95% на основе общей массы состава.

[00525] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно от 0,05 до 0,25% и HPBCD в количестве приблизительно от 99,75 до 99,99% на основе общей массы состава.

[00526] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к составам, состоящим по существу из Соединения D в количестве приблизительно от 0,05 до 0,25% и сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина в количестве приблизительно от 99,75 до 99,95%, на основе общей массы состава.

[00527] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-

ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00528] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит по существу из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00529] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00530] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00531] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит по существу из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00532] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит из: Соединения D в количестве, которое

обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг сульфобутилового простого эфира бета-циклодекстрина и приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 4,5 мл стерильной воды для инъекции.

[00533] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 1875 мг HPBCD и приблизительно 2,1-3,8 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см восстанавливают с 12,5 мл изотонического раствора для инъекции.

[00534] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит по существу из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 1875 мг HPBCD и приблизительно 2,1 - 3,8 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 12,5 мл изотонического раствора для инъекции.

[00535] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 1875 мг HPBCD и приблизительно 2,1 - 3,8 мг муравьиной кислоты, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав в сосуде, объемом 20 куб. см, восстанавливают с 12,5 мл изотонического раствора для инъекции.

[00536] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, содержащему Соединение D в количестве приблизительно от 0,05 до 0,25% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно от 99,1 до 99,9% на основе общей массы твердых веществ и разбавитель.

[00537] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, содержащему Соединение D в количестве приблизительно от

0,05 до 0,25% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно 99,75 - 99,95% на основе общей массы твердых веществ, и разбавитель.

[00538] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, состоящему по существу из Соединения D в количестве приблизительно от 0,05 до 0,25% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно 99,75-99,95% на основе общей массы твердых веществ, и разбавителя.

[00539] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD, приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты и приблизительно 4,5 мл разбавителя.

[00540] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD, приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты и приблизительно 4,5 мл разбавителя.

[00541] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, содержащему Соединение D в количестве приблизительно 0,01 - 0,08% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно 99,50 - 99,99% на основе общей массы твердых веществ и разбавитель.

[00542] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, содержащему Соединение D в количестве приблизительно 0,01 - 0,08% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно 99,50 - 99,99% на основе общей массы твердых веществ и разбавитель.

[00543] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к водному составу, состоящему по существу из Соединения D в количестве приблизительно 0,01 - 0,08% на основе общей массы твердых веществ и HPBCD в количестве приблизительно 99,50 - 99,99% на основе общей массы твердых веществ и разбавителя.

[00544] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-

дифторацетамида, 800 мг HPBCD, приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты и приблизительно 4,5 мл разбавителя.

[00545] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к водному составу, который состоит из: Соединения D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамида, 800 мг HPBCD, приблизительно 0,6 мг муравьиной кислоты и приблизительно 4,5 мл разбавителя.

[00546] Согласно определенным вариантам осуществления состав, раскрытый в настоящем документе, является лиофилизированным, и лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 2,5 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 2,5 - 3,5. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 3,0 - 3,6. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 2,5, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 или 4. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет значение pH приблизительно 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 или 4.

[00547] Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 260-290 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 280 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 260 - 370 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 360 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 350 - 450 мОсм/кг. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав при восстановлении имеет осмоляльность приблизительно 416 мОсм.

[00548] Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав восстанавливают полунормальным физиологическим раствором (0,45% стерильный раствор хлорида натрия для инъекции) и он имеет осмоляльность приблизительно 280 - 320 мОсм/кг при восстановлении. Согласно определенным вариантам осуществления

лиофилизированный состав восстанавливают полунормальным физиологическим раствором (0,45% стерильный раствор хлорида натрия для инъекции), и он имеет значение pH 3,0 - 3,2 и осмоляльность приблизительно 280 - 320 мОсм/кг при восстановлении. Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав восстанавливают с 4,5 мл полунормального физиологического раствора (0,45% стерильный раствор хлорида натрия для инъекции), и он имеет значение pH 3,0 - 3,2 и осмоляльность приблизительно 280 320 мОсм/кг при восстановлении. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят физиологическим раствором (0,9% стерильный раствор хлорида натрия для инъекций) в инфузионном пакете до объема до 50 мл для 30-минутного внутривенного введения.

[00549] Согласно определенным вариантам осуществления лиофилизированный состав восстанавливают физиологическим раствором и он имеет осмоляльность приблизительно 440 мОсм/кг при восстановлении. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 310 - 380 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 310 - 355 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 317 - 371 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 317 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 317 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления восстановленный раствор необходимой дозы разводят нормальным физиологическим раствором до 50 мл с получением раствора для введения дозы, имеющего осмоляльность приблизительно 371 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления осмоляльность раствора для введения дозы составляет не более 352 мОсм/кг. Согласно одному варианту осуществления осмоляльность раствора для введения дозы, содержащего дозу 4,8 мг Соединения D, составляет 352 мОсм/кг.

[00550] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к контейнеру, содержащему состав, раскрытый в настоящем документе. Согласно одному аспекту контейнер представляет собой стеклянный сосуд. Согласно одному аспекту контейнер представляет собой стеклянный сосуд, объемом 20 куб.см.

[00551] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к составу в сосуде, объемом 20 куб. см, который содержит: Соединение D в количестве, которое обеспечивает 1 мг 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид и наполнитель, как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 5 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 4 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 3 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 2 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 1,5 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 1 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав дополнительно содержит не более приблизительно 0,8 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит от приблизительно 0,4 мг до приблизительно 1,5 мг, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1 мг или от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 0,9 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 1 мг или приблизительно 1,5 мг муравьиной кислоты в качестве остаточного растворителя. Согласно одному варианту осуществления состав содержит муравьиная кислота в качестве остаточного растворителя в количестве от приблизительно 1,0 мг/мг Соединения D до приблизительно 1,8 мг/мг Соединения D, от приблизительно 2,1 мг/мг Соединения D до приблизительно 3,8 мг/мг Соединения D или от приблизительно 3,9 мг/мг Соединения D до приблизительно 4,9 мг/мг Соединения D.

[00552] Составы Соединения D, раскрытые в настоящем документе, можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, с применением стандартных терапевтических способов доставки Соединения D, включая без ограничения способы, раскрытые в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, восстанавливают в фармацевтически приемлемом растворителе с получением фармацевтически приемлемого раствора, где раствор вводят (как например, посредством внутривенной инъекции) пациенту.

[00553] Согласно одному аспекту составы, раскрытые в настоящем документе, лиофилизированы, и лиофилизированные составы подходят для восстановления подходящим разбавителем до подходящей концентрации до введения. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав является стабильным при комнатной температуре. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав является стабильным при комнатной температуре в течение до приблизительно 24 месяцев. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав является стабильным при комнатной температуре в течение до приблизительно 24 месяцев, до приблизительно 18 месяцев, до приблизительно 12 месяцев, до приблизительно 6 месяцев, до приблизительно 3 месяцев или до приблизительно 1 месяцев. Согласно одному варианту осуществления лиофилизированный состав является стабильным при хранении при ускоренных условиях 40 °C/75% RH в течение до приблизительно 12 месяцев, до приблизительно 6 месяцев или до приблизительно 3 месяцев.

[00554] Лيوфилизированный состав, раскрытый в настоящем документе, может быть восстановлен для парентерального введения пациенту с применением любого фармацевтически приемлемого разбавителя. Такие разбавители включают без ограничения стерильную воду для инъекции (SWFI), декстрозу 5% в воде (D5W) или систему соразтворителей. Любое количество разбавителя можно применять для восстановления лиофилизированного состава таким образом, что получают подходящий раствор для инъекции. Соответственно, количество разбавителя должно быть достаточным для растворения лиофилизированного состава. Согласно одному варианту осуществления 1 - 5 мл или 1 - 4 мл разбавителя применяют для восстановления лиофилизированного состава с получением конечной концентрации приблизительно 0,05 - 0,3 мг/мл или приблизительно 0,15 - 0,25 мг/мл Соединения D. Согласно определенным вариантам осуществления конечная концентрация Соединения D в восстановленном растворе составляет приблизительно 0,25 мг/мл. Согласно определенным вариантам осуществления конечная концентрация Соединения D в

восстановленном растворе составляет приблизительно 0,20 мг/мл. Согласно определенным вариантам осуществления объем разбавителя для восстановления варьируется между 3 мл и 5 мл с получением конечной концентрации 0,15 - 0,3 мг/мл. Согласно определенным вариантам осуществления для восстановления можно использовать множество сосудов в зависимости от требуемой дозы.

[00555] Восстановленные растворы лиофилизированного состава можно хранить и использовать в течение до приблизительно 24 часов, приблизительно 12 часов или приблизительно 8 часов. Согласно одному варианту осуществления восстановленный водный раствор является стабильным при комнатной температуре приблизительно от 1 до 24, от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10 часов при восстановлении. Согласно одному варианту осуществления восстановленный водный раствор является стабильным при комнатной температуре в течение до приблизительно 20, 15, 12, 10, 8, 6, 4 или 2 часов при восстановлении. Согласно некоторым вариантам осуществления раствор применяют в течение 8 часов получения. Согласно некоторым вариантам осуществления раствор применяют в течение 5 часов получения. Согласно некоторым вариантам осуществления раствор применяют в течение 1 часа получения.

[00556] Способ получения составов

[00557] Составы, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены любым из способов, известных в данной области техники, и как описано в настоящем документе, но все способы включают стадию приведения активного ингредиента в ассоциацию с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, который представляет собой один или несколько необходимых ингредиентов (таких как наполнитель и/или буфер).

[00558] Согласно одному аспекту составы, раскрытые в настоящем документе, получают путем растворения Соединения D, наполнителя и цитратного буфера в воде и диметилсульфоксиде (DMSO) с получением раствора и, необязательно, лиофилизации раствора.

[00559] Согласно одному варианту осуществления способ получения состава предусматривает: растворение HPBCD в цитратном буфере с получением буферного раствора, растворение Соединения D в DMSO для получения премикса, добавление премикса в буферный раствор с получением раствора и необязательно лиофилизацию раствора с получением лиофилизированного состава.

[00560] Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает растворение Kleptose HPB в 20 мМ цитратном буфере с pH от 4 до 4,5 с получением буферного раствора, растворение Соединения D в DMSO с получением активного премикса, добавление премикса в буферный раствор с получением смеси, добавление воды в смесь с получением основного раствора, фильтрование основного раствора через один или несколько фильтров 0,45 мкм и 0,22 мкм с получением отфильтрованного раствора, заполнение отфильтрованным раствором сосуда и лиофилизацию раствора. Согласно одному варианту осуществления раствор фильтруют через один 0,45 мкм и два 0,22 мкм фильтра. Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает растворение Kleptose HPB в 20 мМ цитратном буфере с pH 4,3 с получением буферного раствора, растворение Соединения D в DMSO с получением активного премикса, добавление премикса в буферный раствор с получением смеси, добавление воды в смесь с получением основного раствора, фильтрование основного раствора через один фильтр 0,45 мкм и два фильтра 0,22 мкм с получением отфильтрованного раствора, заполнение отфильтрованным раствором стеклянного сосуда объемом 20 куб.см и при необходимости, лиофилизацию раствора. Согласно одному варианту осуществления после лиофилизации сосуд запаивают в атмосфере азота.

[00561] Согласно одному аспекту составы, раскрытые в настоящем документе, получают растворением Соединения D в муравьиной кислоте с получением премикса, растворением HPBCD в воде с получением раствора, добавлением премикса в раствор с получением раствора лекарственного средства и необязательно лиофилизацией раствора лекарственного средства с получением лиофилизированного состава.

[00562] Согласно одному аспекту составы, раскрытые в настоящем документе, получают растворением Соединения D в муравьиной кислоте с получением активного премикса, растворением Kleptose HPB в воде с получением раствора Kleptose, добавлением премикса к раствору Kleptose с получением смеси, добавлением воды к смеси с получением основного раствора, фильтрованием основного раствора через один или несколько фильтров 0,45 мкм и 0,22 мкм с получением отфильтрованного раствора, заполнение отфильтрованным раствором сосуда и лиофилизацией раствора. Согласно одному варианту осуществления раствор фильтруют через один 0,45 мкм и два 0,22 мкм фильтра. Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает растворение Соединения D в муравьиной кислоте с получением активного премикса, растворение Kleptose HPB в воде с получением раствора Kleptose, добавлением премикса к раствору Kleptose с получением смеси, добавлением воды к

смеси с получением основного раствора, фильтрование основного раствора через один 0,45 мкм и два 0,22 мкм фильтра с получением отфильтрованного раствора, заполнение отфильтрованным раствором стеклянного сосуда объемом 20 куб.см и лиофилизацию раствора. Согласно одному варианту осуществления после лиофилизации флакон запаивают в атмосфере азота.

[00563] Согласно одному аспекту способ лиофилизации предусматривает три стадии: замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Жидкий состав трансформируют в лиофилизированную порошкообразную форму путем полного затвердевания на стадии замораживания, сублимации льда и растворителей посредством первичной сушки и десорбции остаточной влаги и растворителей посредством вторичной сушки. Температура полки и давление в камере при первичной и вторичной сушке контролируют для получения желаемого качества готового лекарственного препарата. Согласно одному аспекту способа внешний вид и структуру кека характеризую посредством визуального осмотра.

5.7. Наборы

[00564] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к набору для идентификации субъекта, страдающего раком, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, содержащему средство определения уровня генной сигнатуры (например, сигнатуры LSC) в образце, который был обработан соединением для лечения, где соединение для лечения представляет собой соединение, раскрытое в разделе 5.5 выше, включая Соединение D.

[00565] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору для лечения рака, содержащему средство определения уровня генной сигнатуры (например, сигнатуры LSC) в образце, который был обработан соединением для лечения, где соединение для лечения представляет собой соединение, раскрытое в разделе 5.5 выше, включая Соединение D.

[00566] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору для контроля эффективности соединения для лечения при лечении рака у субъекта, содержащему средство определения уровня генной сигнатуры (например, сигнатуры LSC) в образце, который был обработан соединением для лечения, где соединение для лечения представляет собой соединение, раскрытое в разделе 5.5 выше, включая Соединение D.

[00567] Согласно определенным вариантам осуществления различных наборов, раскрытых в настоящем документе, соединение для лечения представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, таутомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват, изотополог, пролекарство, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[00568] Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак крови. Согласно одному варианту осуществления раком крови является лимфома. Согласно другому варианту осуществления раком крови является лейкоз. Согласно другому варианту осуществления раком крови является MM. Согласно конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой ALL. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой AML. Согласно другому конкретному варианту осуществления лейкоз представляет собой CLL. Согласно другому варианту осуществления лейкоз представляет собой CML. Согласно некоторым вариантам осуществления AML является рецидивирующим. Согласно определенным вариантам осуществления AML является невосприимчивым. Согласно другим вариантам осуществления AML является устойчивым к обычной терапии.

[00569] Согласно другим вариантам осуществления рак характеризуется повышенным уровнем сигнатуры LSC. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC представляет собой сигнатуру LSC, описанную в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для лечения рака, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC, описанной в настоящем документе, с соединением для лечения. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для лечения лейкоза, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC, описанной в настоящем документе, с соединением для лечения. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для лечения AML, характеризующегося повышенным уровнем сигнатуры LSC, описанной в настоящем документе, с соединением для лечения.

[00570] Согласно определенным вариантам осуществления сигнатура LSC содержит по меньшей мере один ген, выбранный из группы, состоящей из AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC содержит два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, двенадцать, четырнадцать, шестнадцать или все гены, выбранные из группы,

состоящей из AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. Согласно конкретному варианту осуществления сигнатура LSC представляет собой сигнатуру LSC17, содержащую AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46. Согласно некоторым вариантам осуществления сигнатура LSC представляет собой сигнатуру LSC4 или LSC4, раскрытую в настоящем документе, т.е. генную сигнатуру, содержащую следующие 4 гена: TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2. Согласно другим вариантам осуществления сигнатура LSC представляет собой сигнатуру LSC3 или LSC3, раскрытую в настоящем документе, т.е. генную сигнатуру, содержащую следующие 3 гена: SLC4A1, SLC7A7 и AIM2.

[00571] Согласно определенным вариантам осуществления уровень сигнатуры LSC в образце составляет приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100%, в приблизительно 2 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 50 раз или приблизительно 100 раз выше контрольного уровня сигнатуры LSC.

[00572] Согласно определенным вариантам осуществления различных наборов, раскрытых в настоящем документе, образец получают из биопсии опухоли, биопсии узла или биопсии костного мозга, селезенки, печени, головного мозга или молочной железы.

[00573] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к набору для обнаружения уровня мРНК одного или нескольких генов генной сигнатуры. Согласно определенным вариантам осуществления набор содержит один или несколько зондов, которые специфически связываются с мРНК одного или нескольких генов генных сигнатур. Согласно определенным вариантам осуществления набор дополнительно содержит промывочный раствор. Согласно определенным вариантам осуществления набор дополнительно содержит реагенты для проведения гибридизационного анализа, средства выделения или очистки мРНК, средства детекции, а также положительный и отрицательный контроли. Согласно определенным вариантам осуществления набор дополнительно содержит инструкции по применению набора. Набор может быть адаптирован для домашнего использования, клинического использования или использования в исследованиях.

[00574] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к набору для обнаружения уровня белка одного или нескольких генов геномной сигнатуры. Согласно определенным вариантам осуществления наборы содержат тест-полоску, покрытую антителом, распознающим белковый биомаркер, промывочные растворы, реагенты для проведения анализа, средства выделения или очистки белка, средства детекции, а также положительные и отрицательные контроли. Согласно определенным вариантам осуществления набор дополнительно содержит инструкции по применению набора. Набор может быть адаптирован для домашнего использования, клинического использования или использования в исследованиях.

[00575] В таком наборе может использоваться, например, измерительная полоска, мембрана, чип, диск, тест-полоска, фильтр, микросфера, предметное стекло, многолучный планшет или оптическое волокно. Твердой основой набора может быть, например, пластик, кремний, металл, смола, стекло, мембрана, частица, осадок, гель, полимер, лист, сфера, полисахарид, капилляр, пленка, пластина или слайд. Биологическим образцом может быть, например, клеточная культура, клеточная линия, ткань, орган, органелла, биологическая жидкость, образец крови, образец мочи или образец кожи.

[00576] Согласно другому варианту осуществления набор содержит твердую подложку, нуклеиновые кислоты, прикрепленные к подложке, где нуклеиновые кислоты комплементарны по меньшей мере 20, 50, 100, 200, 350 или более основаниям мРНК, и средство для обнаружения экспрессии мРНК в биологическом образце.

[00577] Согласно конкретному варианту осуществления фармацевтический набор или набор для анализа содержит в контейнере соединение или его фармацевтическую композицию и дополнительно содержит в одном или нескольких контейнерах компоненты для выделения РНК. Согласно другому конкретному варианту осуществления фармацевтический набор или набор для анализа содержит в контейнере соединение или фармацевтическую композицию и дополнительно содержит в одном или нескольких контейнерах компоненты для проведения RT-PCR, qRT-PCR, глубокого секвенирования или микрочип.

[00578] Согласно определенным вариантам осуществления в раскрытых в настоящем документе наборах используют средства для обнаружения экспрессии биомаркера с помощью qRT-PCR, микрочипов, проточной цитометрии или иммунофлуоресценции. Согласно другим вариантам осуществления экспрессию биомаркера измеряют с помощью методик на основе ELISA или других подобных способов, известных в данной области техники.

[00579] Согласно другому конкретному варианту осуществления фармацевтический набор или набор для анализа содержит в контейнере соединение или его фармацевтическую композицию и дополнительно содержит в одном или нескольких контейнерах компоненты для выделения белка. Согласно другому конкретному варианту осуществления фармацевтический набор или набор для анализа содержит в контейнере соединение или фармацевтическую композицию и дополнительно содержит в одном или нескольких контейнерах компоненты для проведения проточной цитометрии или ELISA.

[00580] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к наборам для определения генных сигнатур, которые предоставляют материалы, необходимые для измерения распространенности одного или нескольких генных продуктов генных сигнатур или подмножества генных сигнатур (*например*, один, два, три, четыре, пять или более генов), раскрытых в настоящем документе. Такие наборы могут включать материалы и реагенты, необходимые для измерения РНК или белка. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы включают микрочипы, где микрочип состоит из олигонуклеотидов и/или фрагментов ДНК и/или РНК, которые гибридизуются с одним или несколькими генными продуктами генных сигнатур или подмножеством генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, или любой их комбинацией. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут включать праймеры для ПЦР либо продукта РНК, либо копии кДНК продукта РНК генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, или и того и другого. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут включать праймеры для ПЦР, а также зонды для количественной ПЦР. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут включать несколько праймеров и несколько зондов, где некоторые из зондов имеют разные флуорофоры, что позволяет одновременно измерять несколько генных продуктов генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут дополнительно включать материалы и реагенты для создания кДНК из РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут включать антитела, специфичные к белковым продуктам генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. Такие наборы могут дополнительно включать материалы и реагенты для выделения РНК и/или белков из биологического образца. Кроме того, такие наборы могут включать материалы и реагенты для синтеза кДНК из РНК, выделенной из биологического образца. Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы могут включать компьютерное

программное обеспечение, встроенное в машиночитаемый носитель, для прогноза, является ли пациент клинически чувствительным к соединению. Согласно некоторым вариантам осуществления наборы могут включать компьютерное программное обеспечение, встроенное в машиночитаемый носитель, вместе с инструкциями.

[00581] Согласно некоторым вариантам осуществления такие наборы измеряют экспрессию одного или нескольких продуктов нуклеиновых кислот генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. В соответствии с этим вариантом осуществления наборы могут содержать материалы и реагенты, которые необходимы для измерения экспрессии конкретных продуктов нуклеиновых кислот генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. Например, набор микрочипов или ОТ-ПЦР может быть изготовлен для конкретного состояния и может содержать только те реагенты и материалы, которые необходимы для измерения уровней конкретных продуктов транскрипта РНК генных сигнатур или подмножества генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, чтобы прогнозировать, будут ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительна к соединению. В качестве альтернативы, согласно некоторым вариантам осуществления, наборы могут содержать материалы и реагенты, необходимые для измерения экспрессии конкретных продуктов нуклеиновых кислот генов, отличных от генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. Например, согласно определенным вариантам осуществления, наборы содержат материалы и реагенты, необходимые для измерения уровней экспрессии 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, в дополнение к реагентам и материалам, необходимым для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов, отличных от генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления наборы содержат реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере

мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, и 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 или более генов, которые не входят в генные сигнатуры, раскрытые в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления наборы содержат реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, и 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 или 500-1000 генов, которые не входят в генные сигнатуры, раскрытые в настоящем документе.

[00582] Наборы для микрочипов нуклеиновых кислот обычно содержат зонды, прикрепленные к твердой поверхности подложки. Согласно одному такому варианту осуществления зонды могут быть либо олигонуклеотидами, либо более длинными зондами, включая зонды длиной от 150 нуклеотидов до 800 нуклеотидов. Зонды могут быть помечены меткой обнаружения. Согласно конкретному варианту осуществления зонды являются специфичными для одного или нескольких генных продуктов биомаркеров, раскрытых в настоящем документе. Наборы микрочипов могут содержать инструкции по проведению анализа и способы интерпретации и анализа данных, полученных в результате выполнения анализа. Согласно конкретному варианту осуществления наборы содержат инструкции для прогноза, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к соединению. Наборы могут также включать реагенты для гибридизации и/или реагенты, необходимые для обнаружения сигнала, возникающего при гибридизации зонда с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. Как правило, материалы и реагенты для наборов микрочипов находятся в одном или нескольких контейнерах. Каждый компонент набора обычно находится в своем собственном подходящем контейнере.

[00583] Согласно определенным вариантам осуществления набор микрочипов нуклеиновых кислот содержит материалы и реагенты, необходимые для измерения уровней экспрессии 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, или их комбинации, в дополнение к реагентам и

материалам, необходимым для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов, отличных от входящих в генные сигнатуры, раскрытые в настоящем документе. Согласно другим вариантам осуществления набор микрочипов нуклеиновых кислот содержит реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, или их комбинации, и 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450 или более генов, отличных от входящих в генные сигнатуры, раскрытые в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления набор микрочипов нуклеиновых кислот содержит реагенты и материалы, необходимые для измерения уровней экспрессии по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50 или более генов генных сигнатур, раскрытых в настоящем документе, или их комбинации, и 1-10, 1-100, 1-150, 1-200, 1-300, 1-400, 1-500, 1-1000, 25-100, 25-200, 25-300, 25-400, 25-500, 25-1000, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-1000 или 500-1000 генов, отличных от входящих в генные сигнатуры, раскрытые в настоящем документе.

[00584] Для количественной ПЦР наборы обычно содержат предварительно выбранные праймеры, специфичные для конкретных последовательностей нуклеиновых кислот. Наборы для количественной ПЦР могут также включать ферменты, подходящие для амплификации нуклеиновых кислот (например, полимеразы, такие как полимеразы Taq), дезоксинуклеотиды и буферы, необходимые для реакции амплификации. Наборы для количественной ПЦР могут также содержать зонды, специфичные для последовательностей нуклеиновых кислот, связанных с состоянием или указывающих на него. Зонды могут быть

помечены или не помечены флуорофором. Зонды могут быть помечены или не помечены молекулой гасителя. Согласно некоторым вариантам осуществления наборы для количественной ПЦР также содержат компоненты, подходящие для обратной транскрипции РНК, включая ферменты (например, обратные транскриптазы, такие как AMV, MMLV и т.п.) и праймеры для обратной транскрипции, а также дезоксинуклеотиды и буферы, необходимые для реакции обратной транскрипции. Каждый компонент набора для количественной ПЦР обычно находится в своем собственном подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы обычно содержат отдельные контейнеры, подходящие для каждого отдельного реагента, фермента, праймера и зонда. Кроме того, наборы для количественной ПЦР могут содержать инструкции по проведению реакции и способы интерпретации и анализа данных, полученных в результате проведения реакции. Согласно конкретному варианту осуществления наборы содержат инструкции для осуществления прогноза, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к соединению.

[00585] Для наборов на основе антител набор может содержать, например: (1) первое антитело (которое может быть прикреплено или не прикреплено к твердой подложке), которое связывается с представляющим интерес пептидом, полипептидом или белком, и необязательно (2) второе, другое антитело, которое связывается либо с первым антителом, либо с пептидом, полипептидом или белком и конъюгировано с обнаруживаемой меткой (например, флуоресцентной меткой, радиоактивным изотопом или ферментом). Согласно конкретному варианту осуществления представляющий интерес пептид, полипептид или белок связан с состоянием или указывает на состояние (*например*, заболевание). Наборы на основе антитела могут также включать шарики для проведения иммунопреципитации. Каждый компонент наборов на основе антител обычно находится в своем собственном подходящем контейнере. Таким образом, эти наборы обычно содержат отдельные контейнеры, подходящие для каждого антитела и реагента. Кроме того, наборы на основе антител могут содержать инструкции по проведению анализа и способы интерпретации и анализа данных, полученных в результате выполнения анализа. Согласно конкретному варианту осуществления наборы содержат инструкции для прогнозирования того, является ли гематологическая злокачественная опухоль у пациента клинически чувствительной к соединению.

[00586] Согласно одному варианту осуществления набор, раскрытый в настоящем документе, содержит соединение, раскрытое в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, стереоизомер, изотополог, пролекарство, гидрат,

сокристалл, клатрат или полиморф. Наборы могут дополнительно содержать дополнительные активные агенты, включая без ограничения раскрытые в настоящем документе.

[00587] Раскрытые в настоящем документе наборы могут дополнительно содержать устройства, используемые для введения активных ингредиентов. Примеры таких устройств включают без ограничения шприцы, пакеты для капельниц, пластыри и ингаляторы.

[00588] Наборы могут дополнительно содержать клетки или кровь для трансплантации, а также фармацевтически приемлемые носители, которые можно использовать для введения одного или нескольких активных ингредиентов. Например, если активный ингредиент предоставляется в твердой форме, которую необходимо восстановить для парентерального введения, набор может включать герметичный контейнер с подходящим носителем, в котором активный ингредиент можно растворить с образованием стерильного раствора, не содержащего частиц, который подходит для парентерального введения. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают без ограничения воду для инъекций USP, водные носители (такие как без ограничения раствор для инъекций хлорида натрия, раствор Рингера, раствор декстрозы для инъекций, раствор для инъекций декстрозы и хлорида натрия и раствор Рингера с лактатом), смешиваемые с водой носители (такие как без ограничения этиловый спирт, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль) и неводные носители (такие как без ограничения кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, этилолеат, изопропилмиристат и бензилбензоат).

[00589] Согласно определенным вариантам осуществления способов и наборов, раскрытых в настоящем документе, твердофазные подложки используют для очистки белков, мечения образцов или проведения твердофазных анализов. Примеры твердых фаз, подходящих для осуществления описанных в настоящем документе способов, включают шарики, частицы, коллоиды, отдельные поверхности, пробирки, многолуночные планшеты, микротитровальные планшеты, предметные стекла, мембраны, гели и электроды. Когда твердая фаза представляет собой материал в виде частиц (например, шарик), согласно одному варианту осуществления, он распределяется в лунках многолуночных планшето, чтобы обеспечить возможность параллельной обработки твердофазных подложек.

[00590] Следует отметить, что любая комбинация вышеперечисленных вариантов осуществления, например, в отношении одного или нескольких реагентов, таких как без ограничения праймеры для нуклеиновых кислот, твердая подложка и т.п., также

рассматривается в отношении любого из различных способов и/или наборов, раскрытых в настоящем документе.

[00591] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения проиллюстрированы посредством следующих неограничивающих примеров.

6. Примеры

[00592] Приведенные ниже примеры осуществляли с использованием стандартных способов, которые хорошо известны и являются обычными для специалистов в данной области техники, за исключением случаев, когда подробно описано иное. Примеры предназначены только для иллюстрации.

6.1. Оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки

6.1.1. Оценка LSC17

[00593] Оценка 17 генов с использованием популяций функциональных лейкозных стволовых клеток (оценка LSC17) ранее была описана Ng et al. (Ng SW *et al. Nature*. 2016,540(7633): 433-37), которые показали, что оценка LSC17 является высокопрогностической для быстрого определения риска и исхода AML. Более конкретно, высокая оценка LSC17 была связана с начальной устойчивостью к терапии. Пациенты с высокими оценками LSC17 имели плохие результаты при существующих в настоящее время способах лечения, включая аллогенную трансплантацию стволовых клеток. Таким образом, оценка LSC17 предоставила клиницистам инструмент для выявления пациентов с AML, которым не помогает стандартная терапия в соответствии с Ng et al. Как описано в следующих примерах, настоящее изобретение отчасти основано на неожиданном обнаружении специфической корреляции между этой оценкой LSC17 и ответом на лечение соединением D.

[00594] Получение и описание оценки LSC 17 более подробно представлены в следующих абзацах.

[00595] 83 образца клеток, полученные от 78 пациентов с AML, разделяли на фракции на основе экспрессии CD34 и CD38. Активность LSC в каждой фракции оценивали путем ксенотрансплантации мышам NOD.*Prkdc^{scid}.Il2rg^{null}* (NSG). Каждую из функционально определенных фракций 138 LSC+ и 89 LSC– подвергали анализу экспрессии генов (GE). Путем сравнения профилей GE фракций LSC+ и LSC– получали перечень дифференциально экспрессируемых генов, 104 гена показали ≥ 2 -кратные различия в уровне экспрессии ($P < 0,01$).

Эталонный профиль LSC⁺ определяли, как средние уровни экспрессии этих 104 генов во фракциях LSC⁺.

[00596] Для того, чтобы выделить основные транскрипционные компоненты стволовости, которые связаны с клиническими исходами в широком спектре подтипов пациентов с AML, получали большой набор данных о 495 пациентах (Gene Expression Omnibus (GEO), доступ GSE6891 (Verhaak, RG *et al. Haematologica* 94, 131-134 (2009)), где были захвачены 89 из 104 генов DE LSC. Среди 89 генов LSC 43 гена были более высоко экспрессированы во фракциях LSC⁺.

[00597] Применяли алгоритм статистической регрессии на основе оператора наименьшего абсолютного снижения и отбора (LASSO) (Friedman, J., *et al. J. Stat. Softw.* 33, 1–22 (2010), Simon, N., *et al. Stat. Softw.* 39, 1–13 (2011)) для установления связи GE с выживаемостью пациентов в этой обучающей когорте, используя либо полный перечень из 89 генов LSC, либо подмножество из 43 генов, более высоко экспрессируемых во фракциях LSC⁺.

[00598] Анализ последнего подмножества дал оптимальную сигнатуру из 17 генов (показатель LSC17), которую можно вычислить для каждого пациента как взвешенную сумму экспрессии 17 генов, как показано в таблице 2 и в приведенном ниже алгоритме:

Оценка сигнатуры LSC17 = $(DNMT3B \times 0,0874) + (ZBTB46 \times -0,0347) + (NYNRIN \times 0,00865) + (ARHGAP22 \times -0,0138) + (LAPTM4B \times 0,00582) + (MMRN1 \times 0,0258) + (DPYSL3 \times 0,0284) + (KIAA0125 \times 0,0196) + (CDK6 \times -0,0704) + (CPXMI \times -0,0258) + (SOCS2 \times 0,0271) + (SMIM24 \times -0,0226) + (EMP1 \times 0,0146) + (NGFRAP1 \times 0,0465) + (CD34 \times 0,0338) + (AKRIC3 \times -0,0402) + (GPR56 \times 0,0501)$.

[00599] Поскольку оценки выше и ниже среднего в обучающей когорте были связаны с неблагоприятным и благоприятным цитогенетическим риском, соответственно, медианный порог использовали для дискретизации оценок на группы с высокой и низкой оценкой.

Таблица 2. Гены сигнатуры LSC и соответствующие массы в оценке LSC17

Сигнатура гена LSC	Масса
DNMT3B	0,0874
ZBTB46	– 0,0347
NYNRIN	0,00865
ARHGAP22	– 0,0138

LAPTM4B	0,00582
MMRN1	0,0258
DPYSL3	0,0284
KIAA0125	0,0196
CDK6	– 0,0704
CPXM1	– 0,0258
SOCS2	0,0271
SMIM24	– 0,0226
EMP1	0,0146
NGFRAP1	0,0465
CD34	0,0338
AKR1C3	– 0,0402
GPR56	0,0501

[00600] Для вычисления оценки LSC17 лейкозные клетки могут быть собраны из периферической крови пациентов. RNA -Seq можно проводить на клетках пациентов, чтобы охарактеризовать профили экспрессии генов. Параллельно с RNA-Seq РНК, выделенная из образцов пациентов, может быть оценена в анализе NanoString для определения оценки LSC17. Согласно определенным вариантам осуществления образцы пациентов с оценкой LSC17, которая была выше медианного порога, классифицируются в группу с высокой оценкой LSC17, тогда как образцы пациентов, имеющие оценку LSC17 ниже медианного порога, классифицируются в группу с низкой оценкой LSC17.

6.2. Эффективность Соединения D на образце первичного острого миелолейкоза с варьирующимися оценками сигнатуры лейкозной стволовой клетки

[00601] Ниже приведены примеры анализов, которые можно использовать для i) оценки эффективности и механизма действия соединения D на доклинических моделях из первичных образцов AML, полученных у пациентов, с использованием способов *in vitro* и *in vivo*, ii) оценки корреляции оценки LSC17 с эффективностью соединения D и iii) оценки дифференциального эффекта на лейкозные стволовые клетки (LSC) по сравнению с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками (HSC) с помощью моделей вторичного приживления.

6.2.1. Материалы и способы

6.2.1.1. Испытательные животные

[00602] Мыши NOD/SCID, используемые в этом исследовании, представляли собой 10-недельных самок со средней массой тела 20 граммов в начале введения дозы.

6.2.1.2. Клеточные линии/клеточная культура

[00603] Все образцы тестировали на способность к приживлению у мышей NOD/SCID перед использованием в исследованиях эффективности.

[00604] Материалы, используемые для анализа клеток AML *in vitro*, включали среду X-VIVO 10 с добавлением 15% ВИТ и факторов роста, включая 100 нг/мл фактора стволовых клеток, 20 нг/мл интерлейкина (IL)-6, 20 нг/мл гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), 20 нг/мл IL -3, 100 нг/мл лиганда *fms*-подобной тирозинкиназы (Flt 3) (каждый предоставлен Amgen, США), 20 нг/мл гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF; R&D Systems, США) и 50 нг/мл тромбопоэтина (Kirin Brewery, Japan).

[00605] Для анализа колониобразующей единицы (КОЕ) AML использовали полутвердую культуру 0,9% метилцеллюлозы, содержащую 15% фетальной телячьей сыворотки (FCS), 15% предварительно протестированной плазмы человека, 50 мкМ β-меркаптоэтанол и цитокины в концентрациях 100 нг/мл фактора стволовых клеток, 100 нг/мл лиганда Flt-3, 20 нг/мл IL-6, 20 нг/мл GM-CSF, 20 нг/мл IL-3 и 3 ед/мл эритропоэтина (Amgen, США).

6.2.1.3. Материалы и реагенты для анализа

[00606] Аннексин V-PE (BD Pharmingen, BD Bioscience, США) использовали для оценки апоптоза.

[00607] Следующие мышинные анти-человеческие антитела использовали для оценки эффективности Соединения D на ксенотрансплантатных моделях AML (все от BD Biosciences, USA, если не указано иное): мышинное анти-человеческое CD45-APC, CD33-PC5.5 (Beckman Coulter, USA), CD19-V450, CD14-PE, CD15-FITC, CD34 APC-Cy7 и CD38 PE Cy7. Для идентификации мертвых клеток в анализе использовали йодид пропидия (BD, USA).

6.2.2. Дизайн экспериментального исследования

[00608] В этом исследовании лейкозные клетки собирали из периферической крови пациентов в банке лейкоза принцессы Маргарет и подвергали центрифугированию в градиенте фиколла с получением моноклеарных клеток для криоконсервации. Все образцы перед использованием в исследованиях тестировали на способность к приживлению у мышей NOD/SCID. Клетки острого миелолейкоза использовали для краткосрочного культивирования суспензии *in vitro* (4 и 24 часа) для оценки влияния Соединения D на разрушение GSPT1 и апоптоз, анализ AML-CFU для оценки эффекта Соединения D на колониеобразующие клетки-предшественники и трансплантацию ксенотрансплантата мышам NOD/SCID для оценки эффекта Соединения D *in vivo* против AML. После завершения дозирования всех животных подвергали эвтаназии, как это было запланировано, на следующий день после последней дозы Соединения D, и собирали костный мозг из инъецированного правого бедра и неинъецированного левого бедра для проточного цитометрического анализа с использованием специфических для человека антител для оценки приживания трансплантата. Вторичную трансплантацию также проводили с помощью анализа ограничивающих разведений (LDA) для исследования того, воздействует ли Соединение D на лейкозные стволовые клетки со способностью к самообновлению.

6.2.3. Экспериментальные процедуры

6.2.3.1. *In Vitro* разрушение белка 1 фазового перехода G1 в S (GSPT1) Соединением D и анализ апоптоза

[00609] **Получение сток-растворов тестируемого образца и разведения:** Соединение D получали в безводном DMSO с получением 1 М сток-раствора, который затем дополнительно разбавляли до конечных концентраций 3, 30 и 100 нМ.

[00610] **Клеточная культура:** Материалы, используемые для анализа клеток AML *in vitro*, включали среду X-VIVO 10 с добавлением 15% BIT и факторов роста, включая 100 нг/мл фактора стволовых клеток, 20 нг/мл IL-6, 20 нг/мл G-CSF, 20 нг/мл IL-3, 100 нг/мл лиганда Flt 3 (каждый предоставлен Amgen, США), 20 нг/мл GM-CSF (R&D Systems, США) и 50 нг/мл тромбопоэтина (Kirin Brewery, Япония).

[00611] **Процедура анализа:** Через 4 и 24 часа культивирования *in vitro* с DMSO или Соединением D клетки собирали для экспрессии GSPT1 и апоптоза. Уровни GSPT1 анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием средней интенсивности

флуоресценции (MFI) и нормализовали относительно контроля DMSO. Апоптоз также анализировали с помощью проточной цитометрии и измеряли как процент клеток, которые были положительными в отношении расщепляющей каспазы 3/7.

6.2.3.2. Анализ колониеобразующих единиц острого миелолейкоза

[00612] Получение сток-растворов тестируемого образца и разведения:

Соединение D получали как описано ниже.

[00613] Клеточная культура: клетки острого миелолейкоза высевали в 0,9% метилцеллюлозу, содержащую 15% FCS, 15% предварительно протестированной человеческой плазмы, 50 мкМ β-меркаптоэтанола и цитокины при концентрациях 100 нг/мл фактора стволовых клеток, 100 нг/мл лиганда Flt-3, 20 нг/мл IL-6, 20 нг/мл GM-CSF, 20 нг/мл IL-3 и 3 ЕД/мл эритропоэтина (Amgen, США). Клетки острого миелолейкоза культивировали с DMSO или Соединением D (полученным, как описано ниже) во время анализа суспензии и КОЕ.

[00614] Процедура анализа: После того, как культуры AML инкубировали с DMSO или Соединением D в течение 12-14 дней при 37°C, чашкам присваивали оценки по присутствию AML- КОЕ (КОЕ определяется как > 50 клеток).

6.2.3.3. Анализ ксенотрансплантата

[00615] Приготовление испытуемого образца для дозирования: Для дозирования Соединения D in vivo Соединение D готовили непосредственно до введения каждой дозы в соответствии с приведенным ниже протоколом.

[00616] Состав: % NMP/45% полиэтиленгликоль (ПЭГ) 400/50% физиологический раствор, NMP - № по каталогу 69118 (новый номер M79603-1L), Fluka, ПЭГ400 - № по каталогу 81172-1L, Fluka, Физиологический раствор - 0,9% хлорид натрия.

[00617] Получение: Взвешивали желаемое количество Соединения в стеклянной пробирке. Добавляли NMP и перемешивали на вортексе. Убеждались, что все соединение является влажным. Добавляли ПЭГ400 и перемешивали на вортексе до получения прозрачного раствора без твердых частиц. Медленно добавляли физиологический раствор и тщательно перемешивали в течение минуты с помощью ручного гомогенизатора с одноразовым наконечником. Использовали немедленно, так как соединение не является стабильным в составе с течением времени.

[00618] Введение соединения: Соединение D вводили внутривенно. Среду и Соединение D вводили в объеме 2,5 мл/кг два раза в день (BID) (при тестировании дозирования один раз в день [QD] использовали объем дозы 5 мл/кг). Рекомендован протокол два раза в день с 3-часовым интервалом между дозами. Готовили свежий состав для каждого введения, так как соединение не является стабильным в составе с течением времени. Не следует превышать уровень дозы 5 мг/кг два раза в день, так как это приводит к максимальной концентрации C_{max}, которая, вероятно, не будет иметь клинического значения.

[00619] Внутривенная трансплантация: за день до трансплантации мышей NOD/SCID прекондиционировали путем сублетального облучения (275 сГр) с последующей инъекцией анти-CD122-антитела (200 мкг/мышь) для истощения остаточных клеток-хозяев-естественных киллеров (NK). В день трансплантации жизнеспособно замороженные объемные клетки AML (см. раздел 6.2.1.2) размораживали, подсчитывали и трансплантировали внутривенно прекондиционированным мышам в дозе 5×10^6 клеток/мышь в общем объеме 30 мкл фосфатно-солевого буфера.

[00620] Процедура обработки и анализа: На 21-й день после трансплантации AML мышей случайным образом группировали и им вводили либо Соединение D в дозе 2,5 мг/кг, либо среду (5% N-метил-2-пирролидон [NMP]/45% полиэтиленгликоль [ПЭГ] 400 /50% физиологический раствор) внутривенно 2 раза в день в объеме дозы 50 мкл в течение 4 недель. Всех животных подвергали эвтаназии при запланированном прекращении (через 1 день после последней обработки) и собирали костный мозг из правой бедренной кости (костный мозг с инъекцией), левой бедренной кости и левой и правой большеберцовой кости (костный мозг без инъекции). Клетки, выделенные из инъецированного или неинъецированного костного мозга, анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки приживления AML и жизнеспособно замораживали для будущего вторичного анализа приживления.

[00621] Клетки, собранные из инъецированного и неинъецированного костного мозга, окрашивали мышинными античеловеческими антителами, как указано в разделе **Error! Reference source not found.** После окрашивания отмытые клетки анализировали на проточном цитометре LSRII (BD, США), собирая от 10 000 до 20 000 событий для каждого образца. Собранные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar, США) для оценки уровней приживления AML в различных тканях, определяемых процентным содержанием CD45⁺CD33⁺ клеток человека.

[00622] Эксперимент с нормальной пуповинной кровью проводили аналогично тому, что было описано выше, но с использованием клеток CD34⁺, выделенных из нормальной пуповинной крови. Два или три нормальных донора собирали вместе для получения достаточного количества клеток для каждого приживления СВ, обозначенного СВ1 и СВ2.

[00623] **Анализ вторичного ксенотрансплантата с предельным разведением:** Для того, чтобы определить, воздействуют ли соединение D на лейкозные стволовые клетки со способностью к самообновлению, которые, как полагают, способствуют прогрессированию лейкоза, устойчивости к терапии и рецидиву, выполняли вторичную трансплантацию с использованием LDA. Анализы с предельным разведением предназначены для определения неизвестной частоты LSC в общем лейкозном трансплантате первичных мышей. Анализ LDA при вторичной трансплантации позволяет количественно определить, воздействует ли Соединение D на LSC со способностью к самообновлению у первичных мышей. Для этого для вторичной трансплантации использовали множественные дозы клеток для достижения как положительного ответа (мыши с приживленными высокими дозами клеток), так и отрицательного ответа (мыши без приживленных клеток с самой низкой дозой клеток). Четыре разные дозы клеток AML для каждой обработанной группы (1 миллион, 500000, 50 000 и 2000 клеток/мышь) с 5 мышами на дозу клеток, всего 40 мышей на каждый образец трансплантата AML. Для любого образца, который считался агрессивным, LDA выполняли с более низкими дозами клеток. Частоту LSC анализировали с использованием программного обеспечения для биоинформативного анализа экстремальных разбавлений (ELDA) от Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) (bioinf.wehi.edu.au).

[00624] Для вторичной трансплантации мышей NOD/SCID подвергали сублетальному облучению (275 сГр) и предварительно обрабатывали анти-CD122-антителом (200 мкг /мышь) для истощения остаточных естественных киллерных клеток-хозяев. В день трансплантации жизнеспособные замороженные клетки, собранные у первичных мышей, получавших среду или Соединение D, размораживали, подсчитывали, удаляли мышинные клетки (набор для истощения клеток мыши, Miltenyi Biotec, США), и трансплантировали внутрибедренно предварительно обработанным вторичным мышам в предельных дозах, описанных выше. Для вторичной трансплантации без LDA размороженные клетки не были лишены клеток мыши перед трансплантацией. Через 12 недель после вторичной трансплантации мышей подвергали эвтаназии, собирали и анализировали костный мозг.

6.2.3.4. Анализ данных

[00625] Приживление клеток AML в инъецированной бедренной кости и неинъецированной бедренной и большеберцовой кости анализировали с помощью проточной цитометрии. Графики и статистический анализ создавали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного анализа вариаций (ANOVA) с последующим посттестом множественного сравнения Тьюки.

6.2.4. Эффект Соединения D на In Vitro разрушение GSPT1 в клетках острого миелолейкоза

[00626] Десять образцов пациентов с первичным AML тестировали *in vitro*, чтобы выяснить, чувствительны ли клетки первичного AML к Соединению D и различается ли чувствительность к соединению D среди образцов AML. Уровень GSPT1 в клетках AML исследовали сначала, поскольку Соединение D ингибирует жизнеспособность клеток посредством разрушения GSPT1. Соединение D снижало уровни GSPT1 уже через 4 часа после обработки, при этом уровни GSPT1 оставались низкими через 24 часа по сравнению с контролем (фиг. 1A-1B). Эффект Соединения D на снижение уровней GSPT1 зависел от концентрации. Однако даже при самой высокой концентрации Соединения D (100 нМ) уровни деградации GSPT1 различались между образцами AML. Образцы AML, обработанные *in vitro* Соединением D, группировали на основе оценок LSC17, описанных выше. Неожиданно результаты показали, что образцы с высокими оценками LSC17 имели значительно более высокую деградацию GSPT1 по сравнению с образцами с низкими оценками LSC17 (фиг. 1C).

[00627] Ингибирование Соединением D роста лейкозных клеток посредством апоптоза оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки острого миелолейкоза культивировали с Соединением D в течение 24 часов. Репрезентативный проточный цитометрический анализ апоптоза для 3 отдельных образцов показан на фиг. 2A. Апоптоз не наблюдался для всех образцов через 4 часа, однако через 24 часа индукция апоптоза Соединением D наблюдалась в 3 из 10 протестированных образцов в зависимости от концентрации (фиг. 2B). В соответствии с данными о разрушении GSPT1 Соединение D индуцировало апоптоз на более высоких уровнях в образцах с высокими оценками LSC17 по сравнению с образцами с низкими оценками LSC17 (фиг. 2B). Также в соответствии с апоптозом подсчет клеток показал, что при увеличении концентрации Соединение D

уменьшало количество клеток для большинства образцов (фиг. 2C). Клетки из образцов с более высокими оценками LSC17 имели большее снижение числа клеток по сравнению с контролем, чем образцы с более низкими оценками LSC17 (фиг. 2C).

[00628] Колониеобразующие анализы также выполняли, чтобы определить, были ли первичные лейкозные клетки также чувствительными к Соединению D. Из 10 протестированных образцов 7 образывали колонии, и во всех 7 образцах образование колоний было снижено при повышенной концентрации Соединения D (фиг. 3). Из 7 образцов 3 имели высокие оценки LSC17, а 3 других образца имели низкие оценки LSC17. Соединение D снижало образование колоний в образцах с высокими оценками LSC17 в большей степени, чем в образцах с низкими оценками LSC17 (фиг. 3).

[00629] В совокупности эти данные указывают на то, что соединение D оказывает ингибирующее действие на лейкозные бласты и колониобразующие первичные клетки. Образцы с высокими оценками LSC17 были более чувствительными к соединению D, чем образцы с низкими оценками, что оценивали по степени разрушения GSPT1, уровню индукции апоптоза, уменьшению количества бластов и способности к образованию колоний.

6.2.5. In Vivo исследование для определения дозы Соединения D для оценки эффектов на клетки острого миелолейкоза

[00630] Сначала проводили пилотное исследование для определения потенциальной дозы, которую можно использовать для воздействия на первичный трансплантат AML у мышей NOD/SCID. Образцы двух пациентов с AML (AML 110500 и AML 90191) тестировали при 1,25 или 2,5 мг/кг Соединения D один раз в день (QD) или два раза в день (BID) внутрибрюшинно в общей сложности для 4 групп с различными дозами/схемами (фиг. 4). После предварительной обработки сублетальным облучением и анти-CD122 антителом мышам NOD/SCID внутрибедренно трансплантировали клетки AML, которые ранее собирали у пациентов и замораживали. Мышам вводили Соединение D в течение 2 недель после трансплантации, начиная с 21-го дня. Как показано на фиг. 4 (верхняя левая панель), Соединение D уменьшало трансплантат AML клеток образца пациента с AML 110500 дозозависимым образом по сравнению с контролем-носителем. Трансплантаты острого миелолейкоза как в инъецированном правом бедре (RF), так и в неинъецированном костном мозге (BM) значительно уменьшались при 2,5 мг/кг QD и BID Соединения D, с самым высоким снижением трансплантата AML при 2,5 мг/кг BID. Количество примитивных лейкозных клеток,

позитивных по CD34+, также в наибольшей степени уменьшалось под действием Соединения D как в RF, так и в BM у мышей, получавших 2,5 мг/кг BID Соединения D (фиг. 4, в центре слева). Процент клеток, положительных по маркеру миелоидных клеток CD15, также был повышен как в RF, так и в BM у мышей, получавших 2,5 мг/кг два раза в день Соединения D (фиг. 4, внизу слева). Следует отметить, что трансплантированные клетки из образца пациента с AML 90191 практически не подвергались влиянию Соединения D (фиг. 4, правая панель). На основании этого пилотного исследования дозу Соединения D выбирали 2,5 мг/кг два раза в день для остальных экспериментов *in vivo*.

6.2.6. Эффективность Соединения D в отношении трансплантатов острого миелолейкоза у ксенотрансплантированных мышей

[00631] Шесть образцов AML отбирали для исследования *in vivo* на основе оценок LSC17, по 3 образца с высокими и низкими оценками. Клинические характеристики и другая информация приведены в таблице 3 для образцов, использованных для исследований. Два дополнительных образца без данных LSC17 включали в подмножество анализов.

Таблица 3. Характеристики образцов пациентов с острым миелолейкозом для экспериментов In Vivo

Образец	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогенетики MRC	Дополнительные примечания по цитогенетике	NPM1	FLT3 ⁻ ITD	FLT3 ⁻ TKD	Уровни приживления (%) ^a	Сортировка по сигнатуре LSC	LSC17	LSC CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Оценка частоты LSC	ATF4 результаты
590	неклассифицирован, 2° MDS	46,XY,t(3;3)(q21;q26.2) [20]	неблагоприятный	-	nd	nd	nd	8x10 ⁶ клеток 73/71/75/68/74 1x10 ⁶ клеток 0/11/11/2,5	да	высокая	Да	NE	-
110500	m5a, 2°химио/облучение	45,X,-Y,t(11;19)(q23;p13.1) [20] MLL-ENL	промежуточный (ненормальный)	MLL-ENL	nd	nd	nd	да	да	nd	-	NE	CD34 ⁺ + CD38 ⁺ и CD34 ⁺ + CD38-являю тся ATF4 полож итель ными

Образец	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогенетики MRC	Дополнительные примечания по цитогенетике	NPM1	FLT3 ⁻ ITD	FLT3 ⁻ TKD	Уровни приживления (%) ^a	Сортировка по сигнатуре LSC	LSC17	LSC в CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Оценка частоты LSC	ATF4 результаты
90191	M1	46,XY, ider(7)(q10) del(7)(q21)[20]	неблагоприятный	-	nd	nd	nd	да	да	nd	+/- имеет высокую сигнатуру LSC, но дважды положите льный имел низкую	Только CD34 ⁺ CD38 ⁻ повторно е образован ие популяци и мышей при 1/12000	CD34-CD38- являются ATF4 положи тельны й
110770	неклассифицирован	46,XX[20]	промежуточный (нормальный)	-	положительный	положительный	отрицательный	57/5,4/60/37	нет	высокая	-	NE	-
110102	неклассифицирован	45,XX, inv(3)(q21q26), -7 [20]	неблагоприятный	-	nd	nd	nd	77/0	да	высокая	Да	1 в 18034 для +/-,	-

Образец	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогенетики MRC	Дополнительные примечания по цитогенетике	NPM1	FLT3 ⁻ ITD	FLT3 ⁻ TKD	Уровни приживления (%) ^a	Сортировка по сигнатуре LSC	LSC17	LSC в CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Оценка частоты LSC	ATF4 результаты
												1 в 53602 для -/-	
100348	неклассифицирован, 2° (химио/рад)	46,XX[17]	промежуточный (нормальный)	-	отрицательный	отрицательный	отрицательный	32/31/70/85/1,5	да	низкая	не ясно	NE	-
90668	неклассифицирован, 2° химио	nd	nd	-	nd	nd	nd	52,6/20/70/78	да	низкая	Да	-	-
120860	неклассифицирован	46,XX, t(9;11)(p22;q23)[10] MLL-AF9	промежуточный (ненормальный)	MLL-AF9	nd	nd	nd	97/81/95/93	нет	низкая	-	nd	CD34 + CD38 + и CD34 + CD38- являю

Образец	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогенетики MRC	Дополнительные примечания по цитогенетике	NPM1	FLT3-ITD	FLT3-TKD	Уровни приживления (%) ^a	Сортировка по сигнатуре LSC	LSC17	LSC в CD34+/CD38-	Оценка частоты LSC	ATF4 результаты
													тсия ATF4 положительными

ATF4 = активирующий фактор транскрипции 4; MDS = миелодиспластические синдромы; химио = химиотерапия; дел = делеция; Dx = диагностика; FLT3-ITD = связанная с FMS мутация внутренней tandemной дупликации тирозинкиназы 3; FLT3-TKD = мутация домена тирозинкиназы тирозинкиназы 3, связанная с FMS; inv = инвертированный; LSC = лейкозная стволовая клетка; MLL-AF9 = лейкоз смешанного происхождения - острый лимфоидный лейкоз, слитый ген из хромосомы 9; MLL-ENL = лейкоз смешанного происхождения- лейкоз одиннадцать-девятнадцать; MRC = система цитогенетической классификации Совета медицинских исследований (MRC); nd = нет данных; NE = не оценено; NPM = нуклеофосмин; рад = лучевая терапия; t = транслокация; «-» = данные отсутствуют.

^a Уровень приживления показывает процент приживления для отдельных мышей из экспериментов по скринингу. Для образца 590 приживление оценивали при двух уровнях клеточной дозы.

[00632] На основании экспериментальных данных (фиг. 4), в которых один из 2 образцов отвечали на дозу Соединения D в дозе 2,5 мг/кг два раза в день в течение 2 недель, продолжительность введения дозы была увеличена до 4 недель для того, чтобы определить, могут ли мыши переносить более длительное введение Соединения D. За мышами, которым трансплантировали 3 разных образца AML, тщательно следили на предмет клинического состояния во время лечения. Мыши, получавшие Соединение D, не болели и не теряли вес по сравнению с мышами, получавшими среду, после 1, 2 или 3 недель лечения Соединением D (таблица 4). Только одна мышь, получавшая Соединение D, была парализована в последний день лечения и была найдена мертвой на следующее утро перед запланированным умерщвлением. Этой мыши трансплантировали клетки AML из образца пациента 120860, который плохо отвечал на Соединение D (фиг. 6) и, вероятно, умер от тяжелой лейкемии и глубокой инфильтрации, учитывая паралич перед смертью.

Таблица 4. Масса тела мышей с ксенотрансплантатом острого миелолейкоза человека после введения дозы Соединения D

Неделя 1 (г)		Неделя 2 (г)		Неделя 3 (г)	
Среда	Соединение D	Среда	Соединение D	Среда	Соединение D
19	22	19	20	20	20
22	21	23	21	20	22
24	21	24	22	23	23
19	23	20	20	23	21
24	20	24	20	24	19
20	20	19	22	21	22
20	21	20	24	22	24
21	21	21	23	21	22
24	22	23	24	21	24
24	22	23	23	22	21
20	21	20	19	19	20
22	23	21	22	20	21
22	24	22	23	21	22

Неделя 1 (г)		Неделя 2 (г)		Неделя 3 (г)	
Среда	Соединение D	Среда	Соединение D	Среда	Соединение D
21	24	22	21	23	21
22	22	22	21	23	22
Avg = 21,6	Avg = 21,8	Avg = 21,5	Avg = 21,7	Avg = 21,5	Avg = 21,6

Avg = среднее (в среднем).

[00633] Среди 6 образцов AML, протестированных *in vivo* на эффективность Соединения D, клетки пациента с AML 90668 вызывали паралич трансплантированных мышей (5 миллионов клеток на мышь) перед началом лечения Соединением D (день 21). Лечение Соединением D не спасло этих мышей от паралича или смерти. Поэтому для пациента с AML 90668 эксперимент был повторен с меньшим количеством трансплантированных клеток. Мыши все еще были парализованы приблизительно через 4 недели после трансплантации, даже когда было трансплантировано в 10 раз меньше клеток AML (500 000 клеток на мышь). Дозирование Соединения D с 21-го дня не улучшало выживаемость у этих мышей, трансплантированных клетками пациента с AML 90668, вероятно, потому, что этот образец был очень агрессивен у мышей NOD/SCID, с высокими уровнями приживления и быстрой инфильтрацией в другие органы, о чем свидетельствуют быстрый паралич и проникновение лейкозных клеток в селезенку.

[00634] Для других 5 протестированных образцов AML приживление у мышей было достаточным для оценки эффективности Соединения D. Соединение D оказало значительное влияние на 4 из 5 образцов AML. Три из 4 образцов респондентов получили высокие оценки сигнатуры LSC17. Клетки острого миелолейкоза были полностью уничтожены до неопределяемого уровня после введения Соединения D, что оценивали, как по проценту CD45+ лейкозного трансплантата человека, так и по абсолютному количеству лейкозных клеток в RF и BM (фиг. 5, слева). Поскольку Соединение D полностью уничтожало трансплантаты AML во всех 3 образцах пациентов, процентное содержание примитивных клеток CD34+ у мышей, получавших Соединение D, было недостоверным (неспецифические и аутофлуоресцентные явления). Абсолютное количество примитивных клеток CD34+ также было на очень низком и неопределяемом уровне у мышей, получавших Соединение D (фиг. 5, справа).

[00635] Образцы пациентов AML 120860 и AML 100348 имели низкие оценки LSC17. Соединение D не уменьшало количество клеток AML от пациента 120860 в инъецированной бедренной кости. Количество клеток AML было значительно снижено в неинъецированном BM по сравнению со средой-контролем, но эффект был ограниченным по сравнению с уменьшением трансплантатов с высокой LSC17 (см. фиг. 6, верхняя панель). Процент и количество примитивных клеток CD34+ в трансплантате лейкоза этого образца также не снижались под действием Соединения D. Образец AML 100348 имел значительный ответ на обработку соединением D, что определялось снижением CD45+ трансплантата лейкоза человека как в RF, так и в BM (фиг. 6, нижняя панель), однако, у мышей, получавших Соединение D, присутствовал некоторый уровень остаточных бластов и клеток примитивного лейкоза CD34+. Эти результаты показывают, что образцы с низкой оценкой LSC17 могут меньше отвечать на Соединение D, чем образцы с высокими оценками LSC17.

6.2.7. Эффект Соединения D на приживание лейкозных стволовых клеток при вторичной трансплантации

[00636] Для того, чтобы определить, воздействует ли Соединение D на самообновляющиеся лейкозные стволовые клетки AML, клетки, собранные из RF и BM мышей, которым вводили 2,5 мг/кг Соединения D два раза в день или среду, объединяли для трансплантации вторичным мышам. После истощения клеток мыши выполняли LDA для определения частоты LSC в образцах с остаточными клетками AML после введения дозы Соединения D приживленным мышам. Для образцов пациентов AML 90191 и 110500 LDA выполняли на клетках мышей, которым вводили 2,5 мг/кг Соединения D два раза в день. Когда мышей умерщвляли приблизительно через 12 недель после трансплантации, у вторичных мышей, которым трансплантировали клетки AML 90191, выделенные у мышей, получавших первичное лечение Соединением D, не было приживания AML, что указывает на отсутствие остаточных LSC в образце, выделенном у мышей, получавших первичное лечение. Однако клетки AML 110500, выделенные у мышей, получивших первичную дозу, были успешно приживлены мышам вторичной дозы (фиг. 7A). У вторичных мышей, которым трансплантировали клетки от мышей, получавших Соединение D, было гораздо меньше лейкозного трансплантата по сравнению со вторичными мышами, которым вводили клетки, обработанные средой. Более чем 13-кратное снижение частоты LSC наблюдали у первичных мышей, получавших Соединение D, с помощью анализа LDA (фиг. 7A). Клетки от мышей,

которым трансплантировали образец пациента AML 120860, образец с низкими оценками LSC17 и отсутствием ответа на Соединение D у первичных мышей, также успешно повторно образовывали популяции у вторичных мышей в анализе ограничивающих разведений (LDA). Даже при самой низкой дозе клеток (20000 клеток AML на мышь) все мыши, которым трансплантировали клетки от первичных мышей, получавших среду или Соединение D, были приживлены (фиг. 7B). Частоту лейкозных стволовых клеток вычисляли с использованием данных неинъецированного BM. Не было никакой разницы в частоте LSC (рассчитанной с использованием данных по неинъецированному BM) у первичных мышей, получавших среду и Соединение D, что указывает на то, что LSC образца пациента AML 120860 не были мишенью для Соединения D (фиг. 7B). Другой образец с низкой LSC17, AML 100348, имел значительный ответ на Соединение D у мышей, получавших первичную обработку (фиг. 6). Когда клетки из образца пациента AML 100348, собранные у первичных мышей, инъецировали вторичным мышам, от 7500 до 200000 на мышь, ни одна из трансплантированных мышей не показала приживание, даже с клетками, полученными от мышей, получавших среду (фиг. 7C). Вторичные мыши подвергались вторичному образованию популяций только тогда, когда им вводили 1 миллион клеток на мышь от мышей, получавших среду, что указывает на то, что количество клеток, трансплантированных для LDA, было слишком низким. Для оставшихся 3 образцов AML, которые имели высокие оценки LSC17 (AML 0590, 110102 и 110770), анализы с предельным разведением не проводили, поскольку лейкозные клетки почти не обнаруживались в мышинных RF и BM из-за высокой эффективности Соединения D в образцах этих пациентов. Таким образом, для каждого образца пациента комбинированные клетки BM без истощения клеток мыши в каждой группе обработки были поровну разделены на 5 мышей на группу обработки. Процент и общее количество лейкозных клеток CD45+ человека у первичных мышей, а также количество клеток AML, трансплантированных на мышь для каждого состояния, суммированы на фиг. 7D. Вторичные мыши, которым трансплантировали клетки AML110770 либо от мышей, обработанных средой, либо от первичных мышей, которым вводили дозу Соединения D, не подвергались повторному образованию популяции. Вероятно, это связано с тем, что 1) вторичным мышам было трансплантировано слишком мало лейкозных клеток человека (1,21 миллиона клеток для среды-контроля и 0,04 миллиона клеток на мышь для обработанных Соединением D), и 2) трансплантированные мышинные клетки-хозяева конкурировали с лейкозными клетками человека, поскольку истощение мышинных клеток не проводили для этих образцов пациентов.

[00637] Напротив, у вторичных мышей, которым трансплантировали контрольные клетки AML 0590 или AML 110102-среда, было больше приживления клеток AML по сравнению с AML 110770 (фиг. 7D-7E). Однако клетки, полученные от первичных мышей, получавших Соединение D, повторно не образовывали популяции у вторичных мышей, что указывает на то, что остаточные лейкозные клетки у мышей, получавших Соединение D, не были обогащены достаточным количеством LSC со способностью к самообновлению. Эти результаты позволяют предположить, что Соединение D также нацелено на LSC как AML 0590, так и AML 110102.

6.2.8. Эффект Соединения D на трансплантат человека, полученный из нормальной пуповинной крови

[00638] Токсичность соединения D в отношении нормальных гемопоэтических клеток исследовали с использованием образцов СВ. Мышам трансплантировали два разных образца СВ (СВ1 и СВ2) и вводили 2,5 мг/кг Соединения D или среды-контроля В1D внутрибрюшинно. Анализы проточной цитометрии репрезентативной мыши из групп, получавших среду и Соединение D, показаны на фиг. 8А и фиг. 8В, соответственно. Количественная сводка показана на фиг. 9.

[00639] Как показано на фиг. 9А, в то время как Соединение D значительно уменьшало приживление СВ в обоих образцах, клетки СВ оставались приживленными у большинства мышей, получавших Соединение D. Таким образом, Соединение D оказывает меньшее ингибирующее действие на нормальные трансплантаты СВ по сравнению с его действием на респондеров с AML, в частности, по сравнению с образцами с высокими оценками LSC17, которые полностью уничтожаются после введения дозы Соединения D.

[00640] Исследовали клеточную популяцию, наиболее подвергнутую воздействию Соединением D в трансплантате СВ. Обработка Соединением D вызывала значительное сокращение трансплантата человека, однако после обработки оставалось от 5% до 10% трансплантата (фиг. 9А). Это контрастирует с почти полным устранением трансплантата в чувствительных образцах AML (фиг. 5). Количество лимфоцитов CD19+, которые обычно составляют основную клеточную популяцию, развившуюся у иммунодефицитных мышей NOD/SCID, значительно уменьшалось под действием Соединения D (фиг. 9В, верхняя панель). Напротив, доля миелоидных клеток CD33+ увеличивалась после введения дозы Соединения D. Абсолютное количество клеток CD33+ не отражало

повышенной частоты, учитывая, что общее количество всех трансплантатов СВ было резко уменьшено (фиг. 9B). Сходные результаты наблюдались для CD15+ и CD14+ дифференцированных клеток (фиг. 9C). Соединение D не уменьшало гликофорин A (GlyA)+CD45-эритроидные клетки у мышей с трансплантированным СВ1, но вызывало незначительное уменьшение количества эритроидных клеток GlyA+CD45- у мышей с трансплантированным СВ2 (фиг. 9D).

[00641] Также анализировали примитивные гемопоэтические клетки (CD34+) в трансплантате СВ. В отличие от результатов с респондерами AML, Соединение D не снижало процентное содержание клеток CD34+, в то время как абсолютное количество клеток CD34+ значительно снижалось (фиг. 10A) из-за резкого уменьшения общего трансплантата СВ при обработке Соединением D. Подобно клеткам CD34+, процент первичных клеток CD34+CD38-, популяции, обогащенной нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками, не был специфической мишенью для Соединения D (фиг. 10B). В популяции CD34+ только CD34+CD19+ примитивные лимфоидные клетки значительно уменьшались под действием Соединения D (фиг. 10C). CD34+CD33+ примитивные миелоидные клетки не были мишенью для Соединения D (фиг. 10D), что указывает на то, что Соединение D специфически нацелено на CD34+CD19+ примитивные лимфоидные клетки и приводило к снижению количества лимфоцитов.

6.2.9. Заключение

[00642] Соединение D индуцировало дозозависимый апоптоз образцов пациентов с первичным AML *in vitro* посредством разрушения GSPT1. Соединение D уменьшало колониеобразующие предшественники AML *in vitro*. В целом, Соединение D хорошо переносилось мышами NOD/SCID, которым трансплантировали различные первичные образцы AML. Клинических признаков заболевания, в том числе потери массы тела, в течение 4 недель лечения не было. Среди 7 образцов AML (включая 2 образца AML, использованных в пилотном эксперименте с продолжительностью лечения 2 недели), для которых был выполнен полный график лечения, 5 образцов отвечали на Соединение D на мышинной модели ксенотрансплантата человеческого AML. Два образца не отвечали на Соединение D, что указывает на различную чувствительность к соединению D между образцами AML. Эти данные показали в основном прямую связь между оценкой LSC17 и чувствительностью к Соединению D. Образцы острого миелолейкоза с высокими оценками LSC17 были более

чувствительны к лечению Соединением D по сравнению с образцами с низкими оценками LSC17. Это определялось несколькими параметрами, включая уровень разрушения GSPT1, ингибирование роста клеток с индукцией апоптоза, снижение числа колониеобразующих предшественников и эрадикацию трансплантатов AML *in vivo*. Вторичная трансплантация показала, что LSC в лейкозном трансплантате респондеров также были мишенями. LSC из образца AML 120860, который получил низкую оценку генной сигнатуры LSC17 и не отвечает, не были мишенью. Серийную трансплантацию можно проводить с большим количеством образцов пациентов, чтобы подтвердить действие Соединения D на LSC со способностью к самообновлению. Соединение D также уменьшало гемопоэтический трансплантат нормальной пуповинной крови у мышей, но в меньшей степени по сравнению с ответившими на лечение AML. Основными мишенями были CD19⁺ лимфоидные предшественники и лимфоциты трансплантата СВ. Напротив, другие типы клеток человека в трансплантате СВ были гораздо менее чувствительны к Соединению D.

[00643] Данные, полученные при лечении как *in vitro*, так и *in vivo*, ясно показали, что Соединение D ингибирует первичный рост клеток AML посредством разрушения GSPT1. Образцы AML проявляли различную чувствительность к Соединению D. Результаты показали, что образцы с высокими оценками LSC17 более чувствительны к токсичности Соединения D, чем образцы с низкими оценками LSC. Как обсуждалось, оценка LSC17 ранее была признана высокопрогностической и точно предсказывала резистентность к начальной терапии AML, т.е. пациенты с высокими оценками LSC17 имели плохие результаты при существующих в настоящее время способах лечения, включая аллогенную трансплантацию стволовых клеток (Ng SW *et al. Nature*. 2016,540(7633): 433-37). Таким образом, настоящие данные о том, что образцы с высокими оценками LSC17 более чувствительны к Соединению D, указывают на то, что Соединение D может воздействовать на невосприимчивый AML, устойчивый к современным химиотерапевтическим средствам. Кроме того, наблюдение, что Соединение D оказывает меньшее влияние на нормальный гемопоэтический трансплантат, чем у пациентов с AML, подтверждает эффективность Соединения D у пациентов с AML с высокими оценками LSC17.

6.3. Ответчаемость острого миелолейкоза на Соединение D и обнаружение потенциальных прогностических биомаркеров для эффективности Соединения D

[00644] Ниже приведены примеры анализов, которые можно использовать для i) определения соотношения эффективности и устойчивости AML к Соединению D путем проведения экспериментов на большем числе образцов AML, ii) определения потенциальных биомаркеров, которые могут прогнозировать ответ/резистентность AML к Соединению D посредством анализа секвенирования РНК в образцах пациентов с AML.

6.3.1. Материалы и способы

[00645] Подробная информация об испытуемых животных, клеточных линиях/культурах клеток, материалах и реагентах для анализа представлена в Разделе **Error! Reference source not found.**

6.3.2. Экспериментальные процедуры

6.3.2.1. RNA-Seq

[00646] Рибонуклеиновую кислоту (РНК) экстрагировали из первичных лейкозных клеток, количественно определяли и квалифицировали с использованием биоанализатора и запускали для RNA-Seq. Всего для анализа RNA-Seq использовали 33 пациента с диагнозом AML, включая 2 образца (110500 и 90191), которые тестировали на эффект Соединения D в исследовании, описанном в разделе 6.1.

6.3.2.2. Nano String для оценки LSC17

[00647] Рибонуклеиновую кислоту, экстрагированную для RNA-Seq, также отправляли на анализ Nano String для определения оценок LSC17. Анализ проводили с использованием 150 нг РНК в 5 мкл для каждого образца для NanoString с использованием химических анализов элементов. Двадцать образцов с известными высокими и низкими оценками LSC17 были представлены для анализа NanoString в качестве контроля.

6.3.2.3. Получение сток-растворов и разведений Соединения D

[00648] Процедура приготовления растворов Соединения D для введения животным описана в разделе 6.2.3.3.

[00649] Сток-растворы и разведения для экспериментов *in vitro* готовили следующим образом: Соединение D сначала растворяли в безводном диметилсульфоксиде (DMSO) до достижения концентрации 1 М, а затем последовательно разбавляли до различных концентраций (10 мМ, 10 мкМ, 1 мкМ) в готовой среде для культивирования клеток. Конечные концентрации Соединения D для культуры *in vitro* составляли 3 нМ, 30 нМ и 100 нМ.

6.3.2.4. In vivo эффективность Соединения D против AML

[00650] Иммунодефицитных мышей NOD/SCID подвергали сублетальному облучению (225 сГр) и лечили анти-CD122-антителом для эрадикации остаточных мышинных NK-клеток за день до имплантации AML. Первичные клетки AML от каждого пациента вводили внутривенно в правую бедренную кость мыши в дозе клеток 5×10^6 на мышшь, при этом 10 мышей трансплантировали на образец. Лечение Соединением D и средой начинали на день 21 после трансплантации. Соединение D вводили в дозе 2,5 мг/кг внутривенно (IP) два раза в день с интервалом 3 часа в течение 4 недель. Перед каждой обработкой Соединение D растворяли в растворе. Среда представляла собой тот же раствор без Соединения D, который вводили мышам, получавшим контрольное лечение, в том же объеме (50 мкл /мышшь) с тем же терапевтическим режимом, что и при лечении Соединением D. Для каждого образца пациента в каждой группе обработки было 5 мышей.

[00651] После окончания обработки клетки собирали как из инъецированного правого бедра (RF), так и из неинъецированного костного мозга (BM, включая левое бедро, 2 голени) и окрашивали человеческими антителами для оценки уровней приживления AML. Антитела, использованные для окрашивания, включали: мышинные античеловеческие CD45-APC, CD15-FITC, CD34-APC7, CD38-PC7 (BD Biosciences, USA), CD14-PE, CD33-PC5 (Beckman Coulter, USA), CD19-V450, CD19-AF700, CD11b-APC7, CD34-BV421 (BD Biosciences, USA) и иодид пропидия (PI, Invitrogen, USA).

6.3.2.5. In vitro анализы эффектов Соединения D на экспрессию GSPT1, апоптоз и рост колоний клеток первичного лейкоза

[00652] Жизнеспособные замороженные клетки первичного лейкоза оттаивали и помещали в суспензионную культуру в среде Дульбекко в модификации Искова плюс 15% заменителя сыворотки BIT (Stem Cell Technology, Канада), дополненной несколькими факторами роста человека. Соединение D добавляли к культуре в указанных концентрациях.

[00653] Для экспрессии GSPT1 проводили внутриклеточную проточную цитометрию (FACS) через 24 часа в культуре путем окрашивания клеток GSPT1, конъюгированным с Alexa Fluor 647. Для апоптоза клетки собирали через 24 часа в культуре и окрашивали аннексином V-PE и 7-аминоактиномицином D (7AAD) (BD Biosciences, USA).

[00654] Анализы колоний проводили в полутвердой культуре с добавлением факторов роста в присутствии Соединения D или DMSO для контроля. Колонии подсчитывали на 14 день.

6.3.2.6. In vivo эффекты Соединения D на экспрессию GSPT1 на модели ксенотрансплантата AML

[00655] Через 4 недели после трансплантации клеток AML мышам вводили Соединение D в дозе 2,5 мг/кг два раза в день, всего 3 дозы. Через четыре часа после последней обработки клетки собирали как из инъецированного RF, так и из неинъецированного BM каждой мыши и окрашивали CD45-FITC (BD Biosciences, США), фиксировали и подвергали пермеабиллизации. Затем клетки окрашивали GSPT1-Alexa Fluor 647 для внутриклеточной FACS для обнаружения экспрессии GSPT1 в приживленных лейкозных клетках.

6.3.2.7. Анализ данных

[00656] Приживание клеток AML в инъецированной бедренной кости и неинъецированной бедренной кости анализировали с помощью проточной цитометрии. Графики и статистический анализ были созданы с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного анализа вариаций (ANOVA) с последующим посттестом множественного сравнения Тьюки.

6.3.3. Гетерогенные ответы образцов острого миелолейкоза на Соединение D

[00657] В общей сложности 31 образец пациентов с клиническими характеристиками (таблица 5) протестировали в анализах ксенотрансплантатов для определения эффективности Соединения D против AML у мышей. Лейкемическое приживание оценивали по проценту популяции CD45+CD33+ в инъецированном RF и неинъецированном BM. Некоторые образцы показали повторное образование популяций в RF мыши только на низких уровнях с очень низкими или неопределяемыми лейкозными клетками

в ВМ (120347, 130311, 5786 и 141104). Пациент 90156 не образовывал повторные популяции в ни RF мыши, ни ВМ во время анализа. В других образцах AML прижились в как инъецированные RF, так и неинъецированные ВМ (фиг. 11). Большинство приживленных образцов (24 из 28) имели значительный и выраженный ответ на Соединение D, что согласуется с предыдущим пилотным исследованием Соединения D. Соединение D снижало массу AML как в инъецированном RF, так и в неинъецированном ВМ в этих отвечающих образцах, в то время как лейкозные клетки в ВМ имели более выраженные ответы на Соединение D (фиг. 11). Некоторые образцы отвечали меньше, а несколько образцов были устойчивы к соединению D, что указывает на то, что, хотя Соединение D было эффективным против AML, чувствительность разных образцов AML различалась.

Таблица 5. Молекулярные характеристики образцов 31 пациента с острым миелолейкозом

ID пациента	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогенетики MRC	NPM 1	Ft3- ITD	Ft3- TKD
120846	вторичный (MDS)	46,XY,t(1;3)(q32;q26~27),del(20)(q13.1)[11]	неблагоприятный	nd	nd	nd
110625	De novo AML, M0	46,XY	промежуточный (нормальный)	отрицательный	положительный	отрицательный
110555	De novo AML	45,XX,inv(3)(q21q26),-7[20]	неблагоприятный	nd	nd	nd
5786	De novo AML, M2	46, XY, -3, +del(6)(q21)	промежуточный (ненормальный)	nd	nd	nd
90240	De novo AML, M1, рецидив3, перитонеал	52 XX +2 +9 +10 +13 +14 +15	неблагоприятный	nd	nd	nd

ID паци нта	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогене тики MRC	NPM 1	Flt3- ITD	Flt3- TKD
	бная жидкость					
90543	De novo AML, M2	46,XY,inv(3)(q21q26.2),t(9;22)(q34;q11.2)[9] /46,XY[1]	неблагопр иятный	nd	nd	nd
90156	вторичный (MPN), M6	48,XX,+8,+der(9)t(1;9)(q21;p24)[8], 48,XX,+8,+der(9)t(1;9)(q21;q22)[7], 48,XX,+8,+der(9)t(1;9)(q21;q24),+der(9)t(1;9) [4]	промежут очный (ненормал ьный)	nd	nd	nd
100474	вторичный M5a (MDS, миелома, низкой степени, все предшество вало AML)	47,XY,+8[11]	промежут очный (ненормал ьный)	nd	nd	nd
110120	De novo AML	46,XX[20]	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	высок ая	отриц ательн ый
110484	De novo AML, M1	45,XY,inv(3)(q21q26.2),- 7,t(9;22)(q34;11.2)[10]	неблагопр иятный	nd	nd	nd
120093	вторичный (NHL лечили химиотерап ией)	nd	nd	nd	nd	nd
120791	De novo AML, M5	46 XY	промежут очный (нормальн ый)	nd	nd	nd

ID пацие нта	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогене тики MRC	NPM 1	Flt3- ITD	Flt3- TKD
120899	De novo AML, M5a	46,XY	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	полож ительн ый	отриц ательн ый
130262	De novo AML, M5a	46,XX[20]	промежут очный (нормальн ый)	отриц атель ный	низкая	отриц ательн ый
130578	De novo AML, M4	46,XY	промежут очный (нормальн ый)	отриц атель ный	отриц ательн ый	отриц ательн ый
130695	De novo AML, M5a	46,XX[12]	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	высок ая	отриц ательн ый
130712	De novo AML	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[10]	промежут очный (ненормал ьный)	отриц атель ный	отриц ательн ый	отриц ательн ый
120858	De novo AML, M5a, рецидив	46,XX[20]	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	низкая	полож ительн ый
120347	De novo AML	46,XX,t(1;14)(q21;q11.2)	промежут очный (ненормал ьный)	отриц атель ный	низкая	полож ительн ый
121020	De novo AML, M4	46,XY	промежут очный	полож итель ный	полож ительн ый	отриц ательн ый

ID паци нта	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогене тики MRC	NPM 1	Flt3- ITD	Flt3- TKD
			(нормальн ый)			
130607	De novo AML, M5b	46,XX[20]	промежут очный (нормальн ый)	nd	nd	nd
130926	De novo AML, M5a	46,XY	промежут очный (нормальн ый)	отриц атель ный	отриц ательн ый	отриц ательн ый
598	De novo AML, M5b	46,XY	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	полож ительн ый	отриц ательн ый
120287	De novo AML, M1	46,XY	промежут очный (нормальн ый)	отриц атель ный	отриц ательн ый	отриц ательн ый
130311	De novo AML, M4	43,XX,der(2)ins(2;?)(q11.2;?),add(3)(q27),ad d(4)(q12), del(5)(q13q33),der(6)t(4;6)(q12;q13),-7,+8,- 10,del(12)(q15q24.1),idic(13)(p11.2),-14,-15,- 16,add(17)(p11.2),-21,+3mar[11]	неблагопр иятный	nd	nd	nd
130826	De novo AML, M4	46,XY[20]	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	высок ая	отриц ательн ый
140005	De novo AML, M5a	46,XX[20]	промежут очный (нормальн ый)	полож итель ный	проме жуточ ный	отриц ательн ый

ID пацие нта	Диагноз	Цитогенетика при Dx	Класс цитогене тики MRC	NPM 1	Flt3- ITD	Flt3- TKD
140171	De novo AML	46,XY[20]	промежут очный (нормальн ый)	отриц ательн ый	отриц ательн ый	отриц ательн ый
141104	De novo AML	46,XX[10]	промежут очный (нормальн ый)	nd	проме жуточ ный	nd
150238	вторичный (MDS)	47,XY,-7,+21,+21[10]	неблагопр иятный	nd	nd	nd
150250	De novo AML	46,XX[9]	промежут очный (нормальн ый)	полож ительн ый	отриц ательн ый	отриц ательн ый

AML = острый миелолейкоз, Dx = диагностика; FLT3-ITD = связанная с FMS мутация внутренней тандемной дупликации тирозинкиназы 3; FLT3-TKD = мутация домена тирозинкиназы тирозинкиназы 3, связанная с FMS; ID = идентификация, LPD = лимфопролиферативное нарушение, MDS = миелодиспластический синдром, MPN = миелополиферативное новообразование, MRC = изменения, связанные с миелодисплазией, NHL = неходжкинская лимфома, NPM1 = нуклеофосмин 1.

6.3.4. Соединение D индуцировало дифференцировку примитивных клеток острого миелолейкоза

[00658] В связи с наблюдением, что Соединение D оказывает сильное действие против AML у мышей, далее исследовали вопрос о том, воздействует ли Соединение D на примитивные лейкозные клетки и индуцирует их дифференцировку, поскольку клетки AML представляют собой незрелые бласты с блокированием дифференцировки и созревания у пациентов. Особое внимание было уделено образцам, которые все еще имели четкие остаточные лейкозные клетки у мышей после лечения Соединением D. Как показано на фиг. 12А, 3 репрезентативных образца имели явно повышенную экспрессию маркера миелоидной

дифференцировки CD15 после обработки Соединением D. Соединение D также индуцировало экспрессию маркера моноцитарных клеток CD14 в трансплантате пациента 120287. Большинство клеток, полученных от мышей, которым трансплантировали образец пациента 120093, представляли собой примитивные клетки CD34+, лишённые экспрессии CD15. Обработка соединением D индуцировала экспрессию CD15 и, параллельно, уменьшала популяцию клеток CD34+, указывая на то, что в этом образце Соединение D нацеливалось на и дифференцировало примитивные клетки CD34+. Соединение D также снижало количество клеток CD34+ в трансплантате образцов пациентов 100348 и 130826 с уменьшением количества клеток CD14+ или CD11b+ (фиг. 12B). В отличие от этих двух образцов, Соединение D исключало только клетки CD14+ из 100474 с большим количеством остаточных примитивных клеток CD34+ в оставшемся трансплантате. CD11b также является маркером миелоидной дифференцировки и был повышен на трансплантированных клетках пациента 150–250 параллельно с повышенной экспрессией другого маркера миелоидной дифференцировки CD15. Однако Соединение D снижало количество клеток лейкемии CD11b+ при уменьшении количества клеток CD34+ у пациента 130826 (фиг. 12B). Изменения позитивных по CD15, CD14 и CD34 популяций суммированы на фиг. 12C-12E, и 3 различных паттерна после обработки Соединением D очевидны: увеличение, уменьшение или отсутствие изменений популяций в трансплантате AML. Образцы со снижением числа примитивных клеток CD34+ и увеличением числа клеток CD15+ и/или CD14+ представляют собой образцы, хорошо отвечающие на Соединение D (например, образцы пациентов 110555, 110500 и 120093). Образцы, которые не отвечали или плохо отвечали на Соединение D, не имели изменений или даже увеличения числа примитивных клеток CD34+, в то время как некоторые образцы, отвечающие на Соединение D, также имели повышенное количество клеток CD34+ в своем трансплантате. Повышенная экспрессия маркеров миелоидной дифференцировки CD15 и CD14 не наблюдалась в образцах, которые были резистентны или плохо отвечали на Соединение D. Текущие исследования показывают, что, хотя Соединение D резко устраняет трансплантат AML в общем и, таким образом, абсолютное число как примитивных, так и дифференцированных лейкозных клеток было значительно уменьшено, Соединение D нацеливалось на примитивные лейкозные клетки и приводило к миелоидной дифференцировке по меньшей мере в некоторых образцах. Вторичная трансплантация может быть выполнена для определения того, нацелено ли Соединение D на LSC со способностью к самообновлению.

6.3.5. Идентификация биомаркеров ответа на Соединение для лечения острого миелолейкоза

6.3.5.1. Отвечаемость на Соединение D и связь с оценками посредством NanoString

[00659] Острый миелолейкоз представляет собой группу злокачественных гематологических заболеваний, фенотипически и генетически гетерогенных, и их ответ на клиническую индукционную терапию различается у разных пациентов. Для того, чтобы определить, какие пациенты лучше отвечают на Соединение D и оказывает ли Соединение D эффект на образцы, устойчивые к клинической терапии, затем проводили РНК-секвенирование на клетках пациентов, чтобы охарактеризовать профили экспрессии генов в образцах, использованных в исследовании. Параллельно с RNA-Seq РНК, выделенную из образцов пациентов, также направляли на анализ NanoString для определения оценки LSC17, описанной выше. Всего на анализ NanoString было отправлено 33 образца AML (в том числе 31 образец, используемый в действующей поправке к SRA, и 2 образца из предыдущих пилотных исследований SRA). Двадцать образцов, ранее определенных для их оценок LSC17, анализировали параллельно в качестве контроля. Из 33 проанализированных образцов AML только 6 имели низкие оценки LSC17 (см. Таблицу 6), вероятно, из-за использования образцов, которые соответствовали критериям, необходимым для проведения исследования: высокая способность к приживлению в ксенотрансплантатах и наличие большого количества биобанкированных сосудов. Такие образцы обычно характеризуются агрессивным заболеванием с плохим исходом и, следовательно, имеют высокие оценки LSC17.

Таблица 6. Образцы острого миелолейкоза – NanoString для оценок LSC17

ID пациента	Код для РНК	Оценки LSC17 согласно NanoString Raw Score	Оценки LSC17 согласно NanoString Classification
120846	CC01	1,271191073	LSC17hi
110625	CC02	1,053440946	LSC17hi
110555	CC03	1,151928168	LSC17hi
5786 ^a	CC04	1,021199215	LSC17hi
90240	CC05	0,368560828	LSC17lo

ID пациента	Код для РНК	Оценки LSC17 согласно NanoString Raw Score	Оценки LSC17 согласно NanoString Classification
90543	CC06	0,736074529	LSC17hi
90156^a	CC07	1,044834979	LSC17hi
90191^b	CC08	1,382215202	LSC17hi
100474	CC09	0,420008982	LSC17lo
110120	CC10	1,042194461	LSC17hi
110484	CC11	1,304486071	LSC17hi
110500^b	CC12	0,67196099	LSC17hi
120093	CC13	0,266904123	LSC17lo
120791	CC14	0,109565333	LSC17lo
120899	CC15	0,874884102	LSC17hi
130262	CC16	0,779455095	LSC17hi
130578	CC17	0,709446834	LSC17hi
130695	CC18	0,719425415	LSC17hi
130712	CC19	0,80061435	LSC17hi
120858	CC20	0,954879524	LSC17hi
120347^a	CC21	0,63621056	LSC17hi
121020	CC22	0,870600597	LSC17hi
130607	CC23	1,119176906	LSC17hi
130926	CC24	0,53775983	LSC17hi
598	CC25	0,644954458	LSC17hi
120287	CC26	0,338451625	LSC17lo
130311^a	CC27	0,844231421	LSC17hi
130826	CC28	0,902088587	LSC17hi
140005	CC29	0,6012812	LSC17hi
140171	CC30	0,875195998	LSC17hi
141104^a	CC31	0,943161718	LSC17hi
150238	CC32	1,33104564	LSC17hi

ID пациента	Код для PHK	Оценки LSC17 согласно NanoString Raw Score	Оценки LSC17 согласно NanoString Classification
150250	CC33	0,170716767	LSC17lo

ID = идентификация, LSC = лейкозная стволовая клетка, RNA = рибонуклеиновая кислота.

^a Некоторые образцы (120347, 130311, 5786 и 141104) повторно образовывали популяции только в RF мыши (инъектированное правое бедро) на низких уровнях с очень низкими или неопределяемыми лейкозными клетками в BM (неинъектированный костный мозг). Пациент 90156 не образовывал повторно популяции в ни RF мыши, ни BM во время анализа.

^b Образцы изучали в пилотном исследовании SRA, как описано в Разделе 6.1.

[00660] Эталонные значения для классификации высоких и низких оценок LSC17 представлены в таблице 7.

Таблица 7. Эталонные значения для NanoString Classification

ID образца	Предварительная оценка	Классификация
5004	1,42460806	LSC17hi
243	1,34838962	LSC17hi
5326	1,23703093	LSC17hi
110052	1,20989306	LSC17hi
5619	1,19767003	LSC17hi
8315	1,16072595	LSC17hi
110770	1,15114498	LSC17hi
100845	1,11452443	LSC17hi
9030	1,1405956	LSC17hi
8147	1,09154565	LSC17hi
5264	1,05329073	LSC17hi
5199	-0,0391706	LSC17lo
110843	-0,1467073	LSC17lo

ID образца	Предварительная оценка	Классификация
5657	0,10159177	LSC17lo
110029	-0,0768989	LSC17lo
100260	-0,0119696	LSC17lo
443	0,13937079	LSC17lo
100087	-0,1014738	LSC17lo
90335	-0,0103532	LSC17lo
90520	-0,1271686	LSC17lo
9571	-0,04397	LSC17lo
110633	-0,1648828	LSC17lo

hi = высокая оценка, ID = идентификация, lo = низкая оценка.

[00661] Как показано на фиг. 12, между образцами наблюдались гетерогенные ответы, которые можно сгруппировать в 3 подгруппы (фиг. 13). Образцы, которые трансплантировали мышам менее 10% в обработанные средой ткани RF и BM, считались слишком низкими для анализа эффективности и были исключены. У семнадцати образцов был выраженный ответ на Соединение D в их RF, поскольку большинство лейкозных клеток было уничтожено, при этом 14 образцов показали аналогичные ответы в их BM (снижение > 80%, группа 1). Еще 10 образцов имели достаточные ответы, но меньше, чем у группы 1 в их RF, с аналогичными ответами для 6 образцов в BM (снижение от 50 до 75%, группа 2). Остальные 9 образцов имели плохие ответы со снижением RF менее чем на 25%. 4 из 9 образцов вообще не отвечали на Соединение D при инъектированном RF, а в 3 из 6 образцов не показали снижения AML в BM (группа 3). Далее анализировали эффективность Соединения D на основе классификации высоких и низких оценок LSC17, чтобы увидеть, связаны ли они с ответом образцов AML на Соединение D. В то время как один образец с низкой оценкой LSC17 не отвечал на Соединение D в инъектированной правой бедренной кости и имели менее чем 25% снижение в костном мозге без инъекций, другие 7 образцов с низкими оценками LSC17 очень хорошо отвечали на Соединение D (снижение более чем на 50%, фиг. 13). Восемь из 9 образцов без ответа в RF имели высокие оценки LSC17, а 5 образцов из этих 8 образцов без ответа также имели плохие ответы в BM. Интересно, что большинство образцов с высокими оценками LSC17, которые должны иметь более плохой прогноз из-за устойчивости к клинической химиотерапии, хорошо отвечали на Соединение D, снижая лейкоз более чем на 50%. Большое

количество образцов продемонстрировало очень впечатляющие ответы со снижением лейкоза более чем на 80% (13 в RF и 17 в BM, фиг. 13), что указывает на то, что Соединение D является очень эффективным против клеток AML большинства образцов с высокими оценками LSC17.

6.3.5.2. Биомаркеры экспрессии генов для прогноза ответа AML на Соединение D

[00662] Профили экспрессии генов в образцах пациентов, полученных из RNA-Seq, затем анализировали для того, чтобы найти биомаркеры, которые могут прогнозировать ответ AML на Соединение D. Двадцать шесть образцов подходили для анализа. Показатель LSC17 и корреляция со средними профилями экспрессии генов LSC⁺ и LSC[–] не были значимо связаны с процентом снижения AML, вероятно, потому, что большинство образцов, использованных в текущем исследовании, имели высокие оценки LSC и высокий процент снижения AML под действием Соединения D. Таким образом, увеличение количества образцов с низкими оценками LSC значительно повышает шансы на обнаружение значимых тенденций.

[00663] Затем искали оптимизированную подоценку, которая может предсказать ответ на Соединение D, используя процент снижения AML в качестве ответа, чтобы направлять выбор сигнатурных генов. Семьдесят пять процентов образцов (n = 20) использовали в качестве обучающих, а оставшиеся 25 % образцов (n = 6) использовали для тестирования. Когда для обучения и тестирования выбирали гены LSC17 и 43 LSC⁺ (см. раздел 6.1), не было обнаружено ни одной сигнатуры, позволяющей прогнозировать ответ с высокой точностью.

[00664] Однако из 89 генов LSC была идентифицирована 4-генная оценка (см. раздел 6.1), которая может прогнозировать процентное снижение AML с умеренной точностью (фиг. 14, панель A, $r = 0,77$, $p = 0,10$). Дискретизация прогнозов по медиане оценок по всем образцам, использованным в этом исследовании, для «ответа» или «отсутствия ответа» (пороговое значение для отсутствия ответа составляет снижение на 25 %) также показала связь между оценками и % снижения (фиг. 14, панель B, $r = 0,87$, $p = 0,02$). Четыре сигнатурных гена и их стандартизированные массы показаны в таблице 8 и в приведенном ниже алгоритме:

4-генная оценка (оценка сигнатуры LSC4) = $(\text{TNFRSF4} \times -1,13) + (\text{SLC4A1} \times 13,59) + (\text{SLC7A7} \times -3,57) + (\text{AIM2} \times -3,04)$.

[00665] Положительная масса предполагает, что более высокая экспрессия ассоциированного гена будет увеличивать процентное снижение в экспериментах, в то время

как отрицательные массы предполагают, что более высокая экспрессия ассоциированных генов будет уменьшать процентное снижение. TNFRSF4 высоко экспрессируется в образцах LSC+, и экспрессия белка значительно выше при рецидиве по сравнению с диагностическими образцами, где часто наблюдается более высокая частота LSC при рецидиве. Остальные 3 сигнатурных гена экспрессируются выше в образцах LSC–.

Таблица 8. Сигнатурные гены LSC и соответствующие массы в 4-генной оценке

4 гена из 89 генов LSC	Масса
TNFRSF4	-1,13
SLC4A1	13,59
SLC7A7	-3,57
AIM2	-3,04

LSC = лейкозная стволовая клетка.

[00666] Поскольку 3 из 4 генов экспрессировались выше в образцах LSC–, данные LSC– затем анализировали для прогнозирующих подоценок. Сигнатурное обучение на 46 генах LSC– привело к оценке по 3 генам (см. ниже), которая прогнозировала снижение AML, с очень похожими результатами по сравнению с вышеупомянутой оценкой по 4 генам. Действительно, 3 гена, входящие в подоценку с 3 генами, были 3 генами LSC– в подоценке из 4 генов: SLC4A1, SLC7A7 и AIM2 (фиг. 14, панель C), что указывает на то, что образцы LSC– могут лучше отвечать к соединению D. Оценка по 3 генам является следующей:

3-генная оценка (оценка сигнатуры LSC3) = $(SLC4A1 \times 13,59) + (SLC7A7 \times -3,57) + (AIM2 \times -3,04)$.

[00667] В целом, оценка по 4 генам и оценка по 3 генам хорошо коррелируют с ответом на соединение D.

6.3.5.3. Определение клинических характеристик образцов связанных с ответами на Соединение D

[00668] Клинические характеристики образцов исследовали для того, чтобы определить, связаны ли какие-либо клинические профили с ответом на Соединение D. Клетки, собранные у пациентов с вторичным и рецидивирующим AML, имели ответы на Соединение D, сходные с ответами клеток от пациентов с AML de novo как в RF, так и в BM (фиг. 15A). Пациенты с неблагоприятным прогнозом имели даже лучший ответ, чем образцы с

промежуточным прогнозом, исходя из среднего процента уменьшения трансплантата AML у мышей, хотя разница была незначительной (фиг. 15B). Пациенты с аномальными кариотипами, которые обычно имеют неблагоприятный прогноз, также имели лучший ответ, чем образцы с нормальными кариотипами (фиг. 15C). Цитогенетически нормальные образцы AML с Flt3-ITD имели несколько меньший ответ на Соединение D в инъекционном RF, но аналогичный ответ в BM, по сравнению с образцами с Flt3 дикого типа, которые обычно имеют лучший прогноз (фиг. 15D). Хотя число проанализированных в настоящем исследовании образцов пациентов ограничено, образцы рецидивирующего или вторичного AML с аномальной цитогенетикой и неблагоприятным прогнозом отвечают на Соединение D на том же уровне, что и образцы диагностированного *de novo* AML с промежуточным прогнозом.

6.3.6. GSPT1 был мишенью для Соединения D и разрушался им In Vivo

[00669] Механизм, лежащий в основе действия Соединения D против AML, заключается в том, что соединение D разрушает терминатор трансляции GSPT1 путем привлечения GSPT1 к цереблону в комплексе убиквитинлигазы E3. Далее исследовали, снижает ли лечение Соединением D *in vivo* GSPT1 в клетках AML у мышей и отвечает ли разрушение GSPT1 за уменьшение трансплантата AML. Некоторые образцы протестировали *in vitro*, чтобы определить, может ли GSPT1 снижаться в клетках AML с помощью Соединения D перед их использованием для лечения *in vivo*. Подобно ранее проведенным пилотным экспериментам, воздействие Соединения D на клетки AML снижало экспрессию GSPT1 (фиг. 16A). Повышенный апоптоз наблюдали через 24 часа (фиг. 16B) с уменьшением числа живых клеток (фиг. 16C). Колониеобразующие анализы показали, что Соединение D ингибирует колониеобразующие лейкозные клетки-предшественники (фиг. 16D), указывая на то, что соединение D разрушает GSPT1 в лейкозных клетках и ингибирует пролиферацию как лейкозных клеток, так и лейкозных клеток-предшественников посредством индукции апоптоза.

[00670] Далее исследовали индуцирует ли Соединение D также апоптоз в ксенотрансплантатах. После 4 недель обработки Соединением D собранные клетки окрашивали йодидом пропидия (PI) для выявления апоптотических и мертвых лейкозных клеток. Количество событий PI+ было значительно увеличено в костном мозге мыши, что указывает на то, что введение Соединения D приводило к индукции апоптоза и гибели клеток (фиг. 17). Для того, чтобы определить, может ли GSPT1 также разрушаться при введении Соединения D *in vivo*, лейкозные клетки собирали после 3 доз обработки Соединением D для

внутриклеточной проточной цитометрии для оценки уровней GSPT1 как в инъецированном RF, так и в неинъецированном BM. Было обнаружено, что уровни GSPT1 снижены в RF или BM, или как в RF, так и в BM в большинстве из 17 протестированных образцов (фиг. 18A). Вероятно, что Соединение D разрушало GSPT1 более глубоко в инъецированном RF, чем в неинъецированном BM. У большего количества образцов было меньшее снижение GSPT1 в неинъецированном BM, чем в RF. Возможно, это отражает различия в нише или кровоснабжении между этими сайтами, внутрибедренная (IF) инъекция включает расширение бедренной полости перед инъекцией клеток. Уровни снижения GSPT1 под действием Соединения D различались между образцами и не коррелировали с реакцией лейкозных клеток на Соединение D (фиг. 18B). В то время как некоторые образцы, которые хорошо отвечали на соединение D, имели явное снижение GSPT1 как в RF, так и в BM (например, Pt120287 и 110555), другие образцы, реагирующие на Соединение D, не демонстрировали резкого снижения GSPT1 (например, Pt130607 и 150250). В некоторых образцах сокращение GSPT1 различалось между RF и BM, например, Pt 130826 и 150238 имели противоположные ответы GSPT1 в RF и BM. Сложные наблюдения за снижением GSPT1 после кратковременной обработки Соединением D могут быть связаны с гетерогенными ответами между образцами AML. Следует проводить лечение соединением D разной продолжительности для того, чтобы точно зафиксировать снижение GSPT1 *in vivo* для каждого образца AML. Тем не менее, результаты показали, что для большинства образцов GSPT1 может разрушаться Соединением D *in vitro* и у мышей. Однако необходимо протестировать больше образцов, чтобы сделать вывод, может ли разрушение GSPT1 быть биомаркером для прогноза ответа AML на Соединение D.

6.3.7. Заключение

[00671] Исследования с 31 образцом AML показали, что модулятор головного мозга Соединение D очень эффективен против AML на доклинической мышинной модели, включая образцы с неблагоприятным прогнозом и высокими оценками LSC17. Были обнаружены дополнительные оценки в генах, связанных с LSC, которые прогнозируют ответ AML на Соединение D.

[00672] Пациенты с высокими оценками LSC17 обычно устойчивы к стандартной химиотерапии лейкоза, что приводит к более неблагоприятному прогнозу. Наблюдения в текущем исследовании показывают, что Соединение D может быть применимо для

клинических испытаний в качестве нового терапевтического средства для пациентов с AML, чьи заболевания более агрессивны в контексте первичной индукционной терапии, если такие пациенты будут быстро идентифицированы, например, с помощью способа оценки LSC17. Дальнейший анализ ассоциированных с LSC генов из RNA-Seq позволил получить оценку набора из 4 генов, которая может прогнозировать ответность лейкоза на Соединение D. Три из 4 генов представляют собой LSC⁺ гены с функцией прогнозирования, аналогичной оценке по 4 генам.

[00673] В дополнение к индукции апоптоза и гибели клеток под действием Соединения D анализ FACS фенотипов клеток AML после обработки мышей Соединением D показал, что Соединение D также изменяет маркеры клеточной поверхности в некоторых реагирующих образцах, включая маркеры миелоидной дифференцировки CD15, CD14, CD11b, предполагая, что по меньшей мере часть образцов пациентов, получавших лечение, ответила на Соединение D индукцией дифференцировки лейкоза. Параллельно, доля примитивных клеток CD34⁺ в трансплантате AML также уменьшалась при обработке Соединением D. Вторичные эксперименты по трансплантации с анализами предельных разведений (LDA), описанные в разделе 6.4, могут показать, воздействует ли Соединение D также на функциональные LSC, способные воспроизводить AML при серийной трансплантации.

[00674] В целом, благодаря исследованиям действия модулятора головного мозга Соединения D на AML, было показано, что Соединение D оказывает сильное ингибирующее действие на AML в доклинической мышинной модели AML человека. Эти наблюдения обеспечивают важное значение для Соединения D в будущих клинических испытаниях для лечения пациентов с более плохим прогнозом и резистентностью к химиотерапии, и результаты показывают, что Соединение D может снизить вероятность рецидива AML.

6.4. Исследование эффектов Соединения D на стволовые клетки острого миелолейкоза с помощью анализа лимитирующих разведений вторичной трансплантации

6.4.1. Материалы и способы

6.4.1.1. Испытательные животные

[00675] Мыши NOD/SCID, использованные в этом исследовании, представляли собой 10-недельных самок мышей со средней массой тела 20 граммов в начале лечения.

6.4.1.2. Клеточные линии/клетки

[00676] Все образцы пациентов, использованные в этих исследованиях, собирали с информированного согласия Банком лейкоза принцессы Маргарет и подвергали центрифугированию в градиенте фиколла для получения моноклеарных клеток для криоконсервации. Все образцы протестировали на способность к приживлению у NOD/SCID. мышей перед использованием в исследованиях. На следующий день после последней обработки Соединением D мышей, получавших либо среду, либо Соединение D, умерщвляли. Клетки собирали отдельно из правой бедренной кости (RF; инъецированные клетки AML) и неинъецированного костного мозга (BM: левая бедренная кость плюс левая и правая большеберцовая кость), разделяли на аликвоты для анализа FACS для оценки эффективности Соединения D против трансплантата AML у мышей. Оставшиеся клетки из одних и тех же тканей (RF или BM) каждой обработанной группы объединяли и жизнеспособно замораживали для будущей вторичной трансплантации. Для вторичной трансплантации замороженные клетки осторожно оттаивали, фильтровали для удаления мертвых клеток, а затем лейкозные клетки человека очищали с помощью процесса истощения клеток мыши (набор для истощения клеток мыши, каталожный номер 130 -104-694, Miltenyi Biotec). Очищенные клетки подсчитывали, разбавляли для LDA и интрафеморально инъецировали облученным вторичным самкам мышей NOD/SCID.

6.4.1.3. Материалы и реагенты для анализа

[00677] Клетки AML человека, пересаженные в ксенотрансплантат NOD/SCID, идентифицировали по экспрессии маркеров клеточной поверхности CD45 человека (низкие уровни) и CD33. Для обнаружения клеток AML человека во вторичном ксенотрансплантате использовали комбинацию следующих античеловеческих антител : CD45-аллофицинин (APC; номер по каталогу 340943, BD, США), CD33-фикоэритрин-цианин 5 (PECy5; номер по каталогу PN IM2647U, Beckman Coulter, США), CD19V450 (номер по каталогу 560353, BD Biosciences, США), CD14PE (номер по каталогу PN IM0650U, Beckman Coulter, США), CD15-флуоресцеин изотиоцианат (FITC; номер по каталогу 347423, BD, США), CD34-APC-Cy7 (номер по каталогу 624072, BD Biosciences, США) и CD38-PE-Cy7 (номер по каталогу 335790, BD, США).

6.4.2. Дизайн экспериментального исследования

[00678] В этом исследовании проводили вторичную трансплантацию, включая LDA, для изучения того, воздействует ли Соединение D на LSC в качестве мишени со способностью к самообновлению у подвергнутых лечению первичных мышей.

6.4.3. Экспериментальные процедуры

6.4.3.1. Вторичный тест предельного разведения ксенотрансплантата

[00679] **Анализ предельного разведения:** Анализ предельного разведения использовали для определения частоты лейкозных стволовых клеток в общем лейкозном трансплантате у первичных мышей. Следовательно, анализ LDA при вторичной трансплантации позволит количественно определить, воздействует ли Соединение D на лейкозные стволовые клетки лейкемии со способностью к самообновлению у первичных мышей. Для этого для вторичной трансплантации использовали множественные дозы клеток для достижения как положительного ответа (мышь с привитыми высокими дозами клеток), так и отрицательного ответа (мышь без привитых клеток с самой низкой дозой клеток). Использовали четыре разные дозы клеток AML для каждой группы обработки (1 миллион, 500000, 50000 и 2000 клеток/мышь) с 5 мышами на дозу клеток, всего 40 мышей на каждый образец лейкозного трансплантата. Для любого образца, который считался агрессивным, LDA выполняли с более низкими дозами клеток. Частоту LSC анализировали с использованием программного обеспечения для биоинформативного анализа экстремальных разбавлений (ELDA) от Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) (bioinf.wehi.edu.au).

[00680] **Внутрибедренная трансплантация:** за день до трансплантации мышей NOD/SCID подвергали сублетальному облучению (275 сГр) и предварительно обрабатывали анти-CD122-антителом (200 мкг/мышь) для истощения остаточных естественных клеток-киллеров-хозяев. В день трансплантации жизнеспособно замороженные клетки, собранные для комбинированной обработки средой и Соединением D (2,5 мг/кг внутривенно два раза в день в течение 14 дней, раздел 6.1) первичных мышей размораживали, подсчитывали, мышинные клетки истощали и трансплантировали внутрибедренно предварительно обработанным вторичным мышам в предельных дозах в общем объеме 30 мкл. Для образцов, обработанных Соединением D, с низким уровнем приживления AML человека (<25%), клетки как из RF, так и из BM объединяли и проводили 2 раунда истощения у мышей для обеспечения

высокой чистоты клеток BM человека. Проточные цитометрические анализы проводили на проточном цитометре LSRII (BD, США) после истощения клеток мышей, которые показали чистоту более 90%. Для образцов/трансплантатов лейкоза, которые плохо отвечали (например, количество было снижено) на Соединение D, LDA выполняли только с использованием клеток либо из RF, либо из BM, учитывая более высокую популяцию лейкемии. Истощение клеток мыши выполняли в соответствии с инструкциями Miltenyi Biotec (Набор для истощения клеток мыши, номер по каталогу 130-104-694, Miltenyi Biotec, Germany).

[00681] Процедура лечения и анализа: Через 10-12 недель после вторичной трансплантации мышей подвергали эвтаназии и собирали как инъецированный (RF), так и неинъецированный костный мозг (BM) для промывки от взвешенных клеток костного мозга. Приживление AML инъецированного и неинъецированного костного мозга анализировали методом проточной цитометрии с использованием антител, специфичных для человека. Собранные клетки объединяли из инъецированного и неинъецированного костного мозга каждой группы обработки и жизнеспособно замораживали для будущего анализа.

[00682] Клетки, собранные из инъецированной правой бедренной кости и неинъецированной бедренной кости, окрашивали мышиными античеловеческими антителами, как описано выше. После окрашивания отмытые клетки анализировали на проточном цитометре LSRII (BD, США). Всего для каждого образца было собрано от 10 000 до 20 000 событий. Собранные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo для оценки уровней приживления AML в различных тканях, определяемых процентным содержанием клеток CD45+CD33+ человека. Частоту LSC анализировали и сравнивали между группами, получавшими среду и Соединение D, с использованием программного обеспечения ELDA от WEHI (bioinf.wehi.edu.au).

6.4.3.2. Анализ данных

[00683] Приживление AML в инъецированной бедренной кости и неинъецированной бедренной кости анализировали с помощью проточной цитометрии. Строили графики и проводили статистический анализ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного анализа вариаций (ANOVA) с последующим посттестом множественного сравнения Тьюки.

6.4.4. Эффекты Соединения D на эрадикацию бластов острого миелолейкоза в ксенотрансплантатах, включающих лейкозные стволовые клетки

[00684] Все образцы группировали на основе оценки 17 генов, описанной выше. Как в инъецированном RF, так и в неинъецированном BM большинство образцов считались отвечающими или частично отвечающими на Соединение D (29 из 35 образцов), включая образцы с высокими оценками LSC17. Поскольку образцы AML с высокими оценками LSC17, как правило, плохо отвечают на стандартную химиотерапию с более плохим прогнозом, эти данные свидетельствуют о том, что Соединение D может быть нацелено на лейкоз с плохим прогнозом, и эти пациенты могут быть хорошими кандидатами для клинических испытаний для лечения пациентов с невосприимчивым и рецидивирующим лейкозом.

[00685] Для того, чтобы определить, устойчивы ли покоящиеся LSC к Соединению D, проводили вторичную трансплантацию клеток AML образцов высокого ответа. Образцы высокого ответа идентифицировали как образцы, в которых лейкозные клетки почти не обнаруживались в первичном костном мозге мыши после обработки Соединением D. Если редкие покоящиеся LSC сохраняются в остаточных лейкозных клетках после введения дозы Соединения D, тогда эти покоящиеся LSC могут становиться активными и повторно образовывать популяции у вторичных мышей после проведения серийных трансплантаций. Четыре образца с высоким уровнем LSC17, в которых бласты AML были уничтожены обработкой Соединением D, отбирали для вторичной трансплантации (см. таблицу 9) путем инъекции всех комбинированных клеток костного мозга, собранных у 5 первичных мышей, получавших либо среду, либо Соединение D, 5 вторичным мышам. Таким образом, клетки, собранные у одной первичной мыши, инъецировали одной вторичной мыши без какого-либо разбавления дозы клеток или потери каких-либо остаточных клеток. Клетки, собранные у первичных мышей, которым трансплантировали клетки пациентов с AML 130311 и 130826, не пролиферировали/повторно образовывали популяцию ни у одной из вторичных мышей (от первичных мышей, получавших как среду, так и Соединение D). Клетки от пациента с AML 150238, собранные у первичных мышей, получавших среду, повторно образовывали популяцию только у одной из 5 вторичных мышей. Клетки от пациента с AML 150238, полученные от первичных мышей, обработанных Соединением D, повторно не образовывали популяцию ни у одной из вторичных мышей, а клетки этого пациента, полученные от первичных мышей, обработанных средой, повторно образовывали популяцию только у одной из 5 мышей. В то время как клетки пациента с AML 110625, полученные от первичных мышей,

получавших среду, повторно образовывали популяции у всех 5 вторичных мышей с трансплантацией, клетки, полученные от первичных мышей, обработанных Соединением D, повторно образовывали популяции в костном мозге одной вторичной мыши. Кроме того, лейкозные клетки от мышей, получавших Соединение D, не были обнаружены в костном мозге вторичных мышей с трансплантацией, что указывает на то, что в этой выборке респондеров на Соединение D LSC со способностью к самообновлению были мишенями для Соединения D.

Таблица 9. Вторичная трансплантация клеток острого миелолейкоза от первичных ксенотрансплантированных мышей, обработанных средой и соединением D

ID пациент а	LSC1 7 оценк а	LSC17 оценка	In Vivo		Число мышей с привитыми LSC / число инъецированных мышей в группе		Статус LSC у вторичных мышей, которым инъецировал и первичные клетки, обработанны е средой	Статус LSC у вторичных мышей, которым инъецировал и первичные клетки, обработанны е соединением D
			% снижения числа клеток AML (после обработки соединением D, относительно среды)		Сред а	Соединени е D		
			RF	BM				
130311	0,84	LSC17h i	99,8	99,6	0/5	0/4	нет приживлени я	нет приживления

ID пациента	LSC17 оценка	LSC17 оценка	In Vivo эффективность (первичная мышь)		Число мышей с привитыми LSC / число инъецированных мышей в группе		Статус LSC у вторичных мышей, которым инъецировал и первичные клетки, обработанные средой	Статус LSC у вторичных мышей, которым инъецировал и первичные клетки, обработанные соединением D
			% снижения числа клеток AML (после обработки соединением D, относительно среды)		Сред а	Соединени е D		
			RF	BM				
110625	1,05	LSC17h i	99,9	99,9	5/5	1/5 (в BM только)	LSC	LSC в BM только ^a
130826	0,90	LSC17h i	95,0	98,1	0/5	0/5	нет приживлени я	нет приживления
150238	1,33	LSC17h i	95,2	98,7	1/5	0/5	LSC	не LSC

AML = острый миелолейкоз, BM = костный мозг (неинъецированный), ID = идентификация, hi = высокая, LDA = анализ предельного разведения, LSC = лейкозная стволовая клетка, LSC17 = 17-генная оценка лейкозной стволовой клетки, № = номер, RF = правое бедро (инъецировано), Veh = среда.

^a У одной вторичной мыши с приживлением LSC после инъекции клеток AML от первичных мышей, получавших Соединение D, LSC были обнаружены только в неинъецированном костном мозге, но не в RF (клетки AML инъецированы).

Клетки острого миелолейкоза выделяли у первичных мышей, которым вводили среду или соединение D (как из RF, так и из BM), идентифицировали как респондеры и инъецировали вторичным мышам без проведения LDA. Мышей, у которых было более 1% CD45+CD33+ лейкозных клеток человека от общего числа клеток костного мозга в инъецированном правом бедре, считали приживленными AML LSC.

6.4.5. Анализы предельного разведения, проведенные для демонстрации элиминации лейкозных стволовых клеток соединением D в отвечающих образцах

[00686] Серийную трансплантацию с анализами предельных разведений проводили на образцах с остаточными клетками AML человека для того, чтобы определить, снижает ли Соединение D частоту LSC у первичных мышей. Клетки костного мозга мыши сначала истощали от собранного костного мозга инъецированной правой бедренной кости и неинъецированного костного мозга для очистки лейкозных клеток человека. Очищенные лейкозные клетки человека имплантировали внутрибедренно вторичным мышам NOD/SCID с одинаковым количеством клеток для групп, получавших среду и Соединение D. Для каждой группы обработки каждого образца пациента использовали не менее 4 различных доз клеток для вторичных анализов LDA. Вторичным мышам не вводили дозу Соединения D. Вторичных мышей умерщвляли приблизительно через 12 недель после трансплантации для оценки уровней приживления AML при каждой дозе клеток. Мышей, у которых было более 1% CD45+CD33+ лейкозных клеток человека от общего числа клеток костного мозга в инъецированном правом бедре, считали приживленными AML LSC. Частоту LSC анализировали и сравнивали между группами, получавшими среду и Соединение D, с использованием программного обеспечения ELDA от WEHI (bioinf.wehi.edu.au). Репрезентативный LDA вторичной трансплантации показан в таблице 10, таблице 11 и на фиг. 19, чтобы подробно описать, как LDA анализировали с помощью программного обеспечения ELDA. Клетки пациента с AML 130578, полученные у первичных мышей, получавших среду или Соединение D, трансплантировали вторичным мышам в указанных дозах клеток (таблица 10). Количество мышей, трансплантированных и приживленных при каждой дозе клеток для

каждой группы обработки, суммировали (см. Таблицу 10) и вводили в программу ELDA для расчета частот LSC.

Таблица 10. Репрезентативный анализ предельного разведения вторичной трансплантации: результаты инъекции и приживления

Группа	Лечение первичной мыши	Число трансплантированных клеток/мышь	Число приживленных мышей/число трансплантированных мышей
1	Среда	120000	7/7
2		50000	4/5
3		20000	5/5
4		5000	2/5
5	Соединение D	120000	2/3
6		50000	2/5
7		20000	0/5
8		5000	0/5

число = количество

Показана трансплантация и приживление серийно разбавленных клеток острого миелолейкоза от пациента с острым миелолейкозом 130578, выделенных у первичных мышей, получавших среду или Соединение D, вторичным мышам.

[00687] Доверительные интервалы для средней частоты LSC в группе показаны в таблице 11, где частоты LSC оценивали, как 1 LSC на 14536 клеток первичных мышей, получавших среду, и 1 LSC на 136136 клеток первичных мышей, получавших соединение D, достоверное снижение частоты LSC в 9,4 раза после обработки Соединением D по сравнению со средой ($p=6,2 \times 10^{-5}$). На графике репрезентативного доверительного интервала, показанном на фиг. 19, красные линии представляют расчетную среднюю частоту LSC в группе среды-контроля, а окрашенные линии представляют расчетную среднюю частоту LSC в группе первичных мышей, получавших Соединение D. Эти данные показывают, что LSC со способностью к самообновлению у пациента с AML 130578 были значительно элиминированы Соединением D по сравнению со средой-контролем.

Таблица 11. Репрезентативный анализ предельного разведения вторичной трансплантации: доверительные интервалы частот лейкозных стволовых клеток, выделенных у первичных мышей

Группа	Нижний уровень достоверности	Расчетная частота	Верхний уровень достоверности
Соединение D	361399	136136***	51281
Среда	30952	14536	6827

*** = $p < 0,001$ по сравнению с группой среды-контроля.

Оценочную частоту лейкозных стволовых клеток (LSC) с нижним и верхним доверительными интервалами от пациента с острым миелолейкозом 130578 у мышей, получавших Соединение D или среду, рассчитывали с использованием программного обеспечения для анализа экстремальных предельных разведений от Walter and Eliza Hall Institute (доступно по bioinf.wehi.edu.au), и она показана как 1 LSC/клеток в общем (например, Соединения D оценка составляет 1 LSC для каждых 136136 клеток).

[00688] Результаты вторичной трансплантации LDA из 16 образцов пациентов с AML (включая 4 образца, для которых были проведены LDA в первом пилотном исследовании [110500, 120846, 100348 и 09191; раздел 6.1) обобщены в Таблице 12. Три образца не смогли повторно прижиться у вторичных мышей, включая один отвечающий (120791) и два без ответа (90191 и 140171). Другие 13 образцов были способны повторно образовывать популяции у вторичных мышей, включая 8 образцов, которые отвечали на Соединение D у первичных мышей, 2 образца, которые частично отвечали на Соединение D, и 3 образца, которые не отвечали. В шести образцах наблюдали снижение частоты LSC после введения дозы Соединения D при уровнях снижения в от 2,1 до 13,3 раз у первичных мышей. LDA ответившего пациента с AML 130926 показал, что Соединение D не снижало частоту LSC, вероятно, потому, что иницирующая доза клеток была слишком низкой. Самая высокая доза клеток LDA для этого пациента составляла только 200000 клеток на мышь, поскольку Соединение D устраняло большую часть клеток AML у первично ксенотрансплантированных мышей, и только одна мышь из каждой группы обработки показывала повторное образование популяции при этой дозе клеток. В отличие от других респондеров, образцы, полученные у пациентов с AML 110484 и 130695, имели повышение частоты LSC после лечения Соединением D у первичных мышей (увеличение в 1,6 и 12,6 раза, соответственно). Для 3 образцов без ответа пациент с AML 120858 был агрессивным образцом и повторно образовывал популяции у всех мышей при дозе 2000 клеток/мышь (самая низкая доза LDA),

поэтому дозы ниже 2000 клеток должны были быть трансплантированы для определения частоты LSC у мышей, получавших среду и Соединение D. Соединение D не снижало частоты LSC в других 2 образцах без ответа (1,3-кратное и 1,8-кратное увеличение для образцов от пациентов с AML 120860 и 120846, соответственно).

Таблица 12. Обобщение всех образцов для анализа предельного разведения для повторной трансплантации

ID пациен та	LSC17 оценк а	LSC17 класс	In vivo эффективность (% сокращения)		От вет	Ткани, используемые для вторичной трансплантации	LSC частота (1/общее число)		Кратность снижения частоты LSC Соединением D	Р- значение
			RF	BM			Среда	Соединение D		
110500	0,67	LSC17hi	72	67	R	RF	26769	356239	13,3***	0,0006
598	0,64	LSC17hi	46	95	R	RF	315898	675569	2,1	0,31
100348	< 0,50	LSC17lo	86	90	R	RF + BM	230162	923814	4,0	0,053
120899	0,87	LSC17hi	13	67	R	BM	6820	27120	4,0	0,088
130695	0,72	LSC17hi	52	86	R	RF	461681	36696	- 12,6*** ^a	0,0000058
110484	1,30	LSC17hi	73	96	R	RF	1894424	1153831	- 1,6 ^a	0,62
130578	0,71	LSC17hi	61	73	R	RF + BM	14536	136136	9,4***	0,000062
130926	0,54	LSC17hi	70	85	R	RF + BM	1207241	1207241	1,0	0,87
130712	0,80	LSC17hi	17	56	PR	BM	282636	758064	2,7	0,078
121020	0,87	LSC17hi	42	52	PR	RF + BM	5124582	7562084	1,5	0,994
120860	< 0,50	LSC17lo	1	20	NR	BM	81993	65626	- 1,3 ^a	0,681
120846	1,27	LSC17hi	9	26	NR	RF	65261	14523	- 1,8 ^a	0,35
120858	0,95	LSC17hi	0	2	NR	BM	NC	NC	NA ^b	ND
90191	1,38	LSC17hi	-21	-250	NR	RF + BM	нет приживления	нет приживления	NA	ND
140171	0,88	LSC17hi	4	28	NR	RF + BM	нет приживления	нет приживления	NA	ND
120791	0,11	LSC17lo	69	98	R	RF + BM	нет приживления	нет приживления	NA	ND

BM = костный мозг (неинъецированный); ID = идентификация; LSC = лейкозная стволовая клетка; LSC17 = 17 генная оценка лейкозной стволовой клетки; NA = не применимо; NC = не рассчитано; ND = не определено; NR = не отвечающий; PR = частичный респондер; R = респондер; RF = правое бедро (инъецировано); Veh = среда. *** = $p < 0,001$.

^a Все мыши, которым трансплантировали самые низкие дозы клеток из обеих групп обработки, показали приживание, поэтому кратное изменение частоты LSC неприменимо.

^b Отрицательный знак указывает на кратное увеличение изменения.

Клетки острого миелолейкоза выделяли у первичных мышей, которым инъецировали клетки острого миелолейкоза (AML), получавших среду или Соединение D, и оценивали по шкале LSC17 ($LSC17_{hi} \geq 0,50$) и чувствительности *in vivo* к Соединению D на основе снижения количества клеток AML по сравнению со средой-контролем. Образцы пациентов классифицировали на основе процентного снижения числа клеток AML в RF или BM после обработки Соединением D по сравнению со средой ($R \Rightarrow 60\%$; $PR = 30-60\%$; $NR = <30\%$). Клетки (из RF, BM или обоих) разводили в LDA и вводили облученным вторичным мышам, где частоту LSC определяли с использованием программного обеспечения для анализа экстремальных разбавлений от Walter and Eliza Hall Institute (bioinf.wehi.edu.au) и приводили как 1 LSC/ клеток в общем. Кратность изменения частоты под действием Соединения D определяли по сравнению со средой-контролем и оценивали с помощью однофакторного анализа вариации. Значение P представляет собой сравнение изменения частоты LSC для обработанных соединением D по сравнению с контролем.

6.4.6. Заключение

[00689] После лечения Соединением D мышей NOD/SCID, несущих человеческий AML, проводили вторичные трансплантации с LDA, чтобы определить, способно ли Соединение D воздействовать на LSC. В большинстве чувствительных образцов лейкоза LSC были мишенью для Соединения D с различным снижением частоты (6 из 10 образцов). Частота LSC не снижалась у одного респондента и повышалась у 2 респондентов на лечение Соединением D. Соединение D не снижало частоты LSC у 3 не ответивших образцов, которые повторно образовывали популяции у вторичных мышей В целом, эти результаты показывают, что Соединение D не только воздействует на лейкозные бласты респондеров на мышинной модели AML человека, но также снижает LSC, обладающие способностью к самообновлению.

Тот факт, что Соединение D не воздействовало на LSC во всех образцах AML, отражает гетерогенность резистентности и ответа LSC при AML на Соединение D.

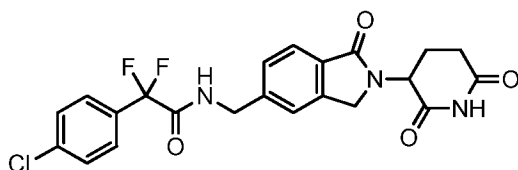
[00690] Из вышеизложенного должно быть понятно, что, хотя конкретные варианты осуществления были описаны в настоящем документе с целью иллюстрации, могут быть сделаны различные модификации без отклонения от сущности и объема, раскрытого в настоящем документе. Все ссылки, упомянутые выше, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации субъекта, страдающего острым миелолейкозом (AML), который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающий:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце,
- iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня,

где соединение представляет собой 2-(4-хлорфенил)-N-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2-дифторацетамид (Соединение D), которое имеет следующую структуру:



или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

2. Способ лечения субъекта, страдающего AML, соединением, предусматривающий:

(a) идентификацию субъекта, страдающего AML, который может отвечать на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающую:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. измерение уровня экспрессии гена одного или нескольких генов в образце,
- iii. вычисление оценки сигнатуры лейкозной стволовой клетки (LSC) для образца на основе уровня экспрессии гена одного или нескольких генов, и
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если уровень оценки сигнатуры LSC выше ее контрольного уровня, и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение,

где соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

3. Способ по п. 1 или 2, где оценку сигнатуры LSC вычисляют как взвешенную сумму уровня экспрессии одного или нескольких генов.

4. Способ по любому из пп. 1 - 3, где контрольный уровень представляет собой медианную оценку сигнатуры LSC в популяции.

5. Способ по любому из пп. 1 - 3, где контрольный уровень представляет собой предварительно определенный уровень оценки сигнатуры LSC.

6. Способ по любому из пп. 1 - 5, где оценка сигнатуры LSC, которая выше ее контрольного уровня, предполагает, что субъект имеет устойчивый и/или невосприимчивый AML.

7. Способ по любому из пп. 1 - 6, где один или несколько генов выбраны из группы, состоящей из

(a) CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56, AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4, GATA2, SLC25A37, SGK, LOC652694, ITPR3, LOC654103, CXCR4, FCRL3, RBM38, LILRA5, IL18RAP, CCDC109B, ISG20, MTSS1, CECR1, ADAM19, FCGR2A, AIM2, NPL, IL10RA, CTSL1, GNLY, CKAP4, ADM, KLRB1, SLC15A3, FGR, FCRLA, IL2RB, CXCL16, SLC4A1, GZMH, FLJ22662, LOC647506, GIMAP4, JAZF1, CTSH, GZMA, CHST15, AQP9, CD247, BCL6, SLC7A7, E2F2, LOC647450, GZMB, LOC652493, HBM, CD14, ALAS2, HBB, LOC642113, AHSP, FCN1, CD48, HBA2 и HBA1, или

(b) CD34, SPINK2, LAPTM48, HOXA5, GUCY1A3, SHANK3, ANGPT1, ARHGAP22, LOC284422, MYCN, MAMDC2, PRSSL1, KIAA0125, GPSM1, HOXA9, MMRN1, FSCN1, DNMT38, HOXA6, AIF1L, SOCS2, CDK6, FAM69B, NGFRAP1, C3orf54, CPXM1, TNFRSF4, ZBTB46, DPYSL3, NYNRIN, COL24A1, FAM30A, C10orf140, SPNS2, GPR56,

AKR1C3, FLT3, TFPI, KCNK17, EPDR1, C1orf150, BIVM, H2AFY2, VWF, EMP1, RAGE, ATP8B4 и GATA2.

8. Способ по любому из пп. 1 - 6, где один или несколько генов выбраны из группы, состоящей из AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46.

9. Способ по любому из пп. 1 - 6, где оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов AKR1C3, ARHGAP22, CD34, CDK6, CPXM1, DNMT3B, DPYSL3, EMP1, GPR56, KIAA0125, LAPTM4B, MMRN1, NGFRAP1, NYNRIN, SMIM24, SOCS2 и ZBTB46.

10. Способ по любому из пп. 1 - 6, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B $\times$ масса DNMT3B) + (уровень экспрессии ZBTB46 $\times$ масса ZBTB46) + (уровень экспрессии NYNRIN $\times$ масса NYNRIN) + (уровень экспрессии ARHGAP22 $\times$ масса ARHGAP22) + (уровень экспрессии LAPTM4B $\times$ масса LAPTM4B) + (уровень экспрессии MMRN1 $\times$ масса MMRN1) + (уровень экспрессии DPYSL3 $\times$ масса DPYSL3) + (уровень экспрессии KIAA0125 $\times$ масса KIAA0125) + (уровень экспрессии CDK6 $\times$ масса CDK6) + (уровень экспрессии CPXM1 $\times$ масса CPXM1) + (уровень экспрессии SOCS2 $\times$ масса SOCS2) + (уровень экспрессии SMIM24 $\times$ масса SMIM24) + (уровень экспрессии EMP1 $\times$ масса EMP1) + (уровень экспрессии NGFRAP1 $\times$ масса NGFRAP1) + (уровень экспрессии CD34 $\times$ масса CD34) + (уровень экспрессии AKR1C3 $\times$ масса AKR1C3) + (уровень экспрессии GPR56 $\times$ масса GPR56), и

где масса DNMT3B находится в диапазоне от 0,08 до 0,09, масса ZBTB46 находится в диапазоне от $-0,03$ до $-0,04$, масса NYNRIN находится в диапазоне от $-0,008$ до $0,009$, масса ARHGAP22 находится в диапазоне от $-0,015$ до $0,01$, масса LAPTM4B находится в диапазоне от $-0,006$ до $0,005$, масса MMRN1 находится в диапазоне от $0,02$ до $0,03$, масса DPYSL3 находится в диапазоне от $0,02$ до $0,03$, масса KIAA0125 находится в диапазоне от $0,01$ до $0,02$, масса CDK6 находится в диапазоне от $-0,08$ до $-0,07$, масса CPXM1 находится в диапазоне от $-0,02$ до $-0,03$, масса SOCS2 находится в диапазоне от $0,02$ до $0,03$, масса SMIM24 находится в диапазоне от $-0,02$ до $-0,03$, масса EMP1 находится в диапазоне от $0,014$ до $0,02$, масса NGFRAP1 находится в диапазоне от $0,04$ до $0,05$, масса CD34 находится в диапазоне от $0,03$ до $0,04$, масса AKR1C3 находится в диапазоне от $-0,04$ до $-0,05$, и масса GPR56 находится в диапазоне от $0,04$ до $0,055$

11. Способ по любому из пп. 1 - 6, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии DNMT3B $\times 0,0874$) + (уровень экспрессии ZBTB46 $\times -0,0347$)

+ (уровень экспрессии NYNRIN $\times$ 0,00865) + (уровень экспрессии ARHGAP22 $\times$ - 0,0138) + (уровень экспрессии LAPTM4B $\times$ 0,00582) + (уровень экспрессии MMRN1 $\times$ 0,0258) + (уровень экспрессии DPYSL3 $\times$ 0,0284) + (уровень экспрессии KIAA0125 $\times$ 0,0196) + (уровень экспрессии CDK6 $\times$ - 0,0704) + (уровень экспрессии CPXM1 $\times$ - 0,0258) + (уровень экспрессии SOCS2 $\times$ 0,0271) + (уровень экспрессии SMIM24 $\times$ - 0,0226) + (уровень экспрессии EMP1 $\times$ 0,0146) + (уровень экспрессии NGFRAP1 $\times$ 0,0465) + (уровень экспрессии CD34 $\times$ 0,0338) + (уровень экспрессии AKR1C3 $\times$ - 0,0402) + (уровень экспрессии GPR56 $\times$ 0,0501).

12. Способ по п. 11, где контрольный уровень составляет 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2.

13. Способ по любому из пп. 1 - 6, где оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов TNFRSF4, SLC4A1, SLC7A7 и AIM2.

14. Способ по п. 13, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии TNFRSF4 $\times$ масса TNFRSF4) + (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ масса SLC4A1) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ масса SLC7A7) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ масса AIM2), и где масса TNFRSF4 находится в диапазоне от - 1,5 до -1, масса SLC4A1 находится в диапазоне от 13 до 14, масса SLC7A7 находится в диапазоне от - 4 до -3, масса AIM2 находится в диапазоне от - 3 до -4.

15. Способ по п. 13, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии TNFRSF4 $\times$ - 1,13) + (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ 13,59) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ - 3,57) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ - 3,04).

16. Способ по п. 15, где контрольный уровень находится в диапазоне от - 50 до 115, от - 45 до 110, от - 40 до 105, от - 37 до 100, от - 30 до 95, от - 25 до 90, от - 20 до 85, от - 15 до 80, от - 10 до 75, от - 5 до 70, от 0 до 65, от 5 до 60, от 10 до 55, от 15 до 50, от 20 до 45, от 25 до 40 или от 30 до 35.

17. Способ по любому из пп. 1 - 6, где оценка сигнатуры LSC основана на уровнях экспрессии генов SLC4A1, SLC7A7 и AIM2.

18. Способ по п. 17, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ масса SLC4A1) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ масса SLC7A7) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ масса AIM2), и где масса SLC4A1 находится в диапазоне от 11 до 15, масса SLC7A7 находится в диапазоне от - 5,5 до - 1,5, масса AIM2 находится в диапазоне от - 5 до - 1.

19. Способ по п. 17, где оценку сигнатуры LSC вычисляют следующим образом: (уровень экспрессии SLC4A1 $\times$ 13,59) + (уровень экспрессии SLC7A7 $\times$ - 3,57) + (уровень экспрессии AIM2 $\times$ - 3,04).

20. Способ по п. 19, где контрольный уровень находится в диапазоне от - 65 до 110, от - 60 до 105, от - 55 до 100, от - 49 до 93, от - 45 до 90, от - 40 до 85, от - 35 до 80, от - 30 до 75, от - 25 до 70, от - 20 до 65, от - 15 до 60, от - 10 до 55, от - 5 до 50, от 0 до 45, от 5 до 40, от 10 до 35, от 15 до 30, от 20 до 35 или от 25 до 30.

21. Способ идентификации субъекта, страдающего AML, который вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего AML, на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающий:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. введение соединения в образец,
- iii. измерение доли одного или нескольких типов клеток,
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если доля одного или нескольких типов клеток отличается от контрольной доли клеток,

где соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

22. Способ лечения субъекта, страдающего AML, соединением, предусматривающий:

(а) идентификацию субъекта, страдающего AML, который может отвечать на лечение, предусматривающее соединение, предусматривающую:

- i. взятие образца у субъекта,
- ii. введение соединения в образец,
- iii. измерение доли одного или нескольких типов клеток,
- iv. идентификацию субъекта как вероятно отвечающего на лечение, предусматривающее соединение, если доля одного или нескольких типов клеток отличается от контрольной доли клеток, и

(b) введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, если субъект идентифицирован как вероятно отвечающий на лечение, предусматривающее соединение,

где соединение представляет собой Соединение D или его стереоизомер или смесь стереоизомеров, изотополог, фармацевтически приемлемую соль, таутомер, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

23. Способ по п. 21 или 22, где контрольная доля типа клеток представляет собой долю типа клеток в образце до введения соединения.

24. Способ по п. 21 или 22, где контрольная доля типа клеток представляет собой предварительно определенную долю.

25. Способ по любому из пп. 21 - 24, где способ предусматривает измерение доли зародышевых клеток и/или доли дифференцированных лейкозных клеток.

26. Способ по п. 25, где сокращение доли зародышевых клеток и/или увеличение доли дифференцированных лейкозных клеток по сравнению с их соответствующими долями до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

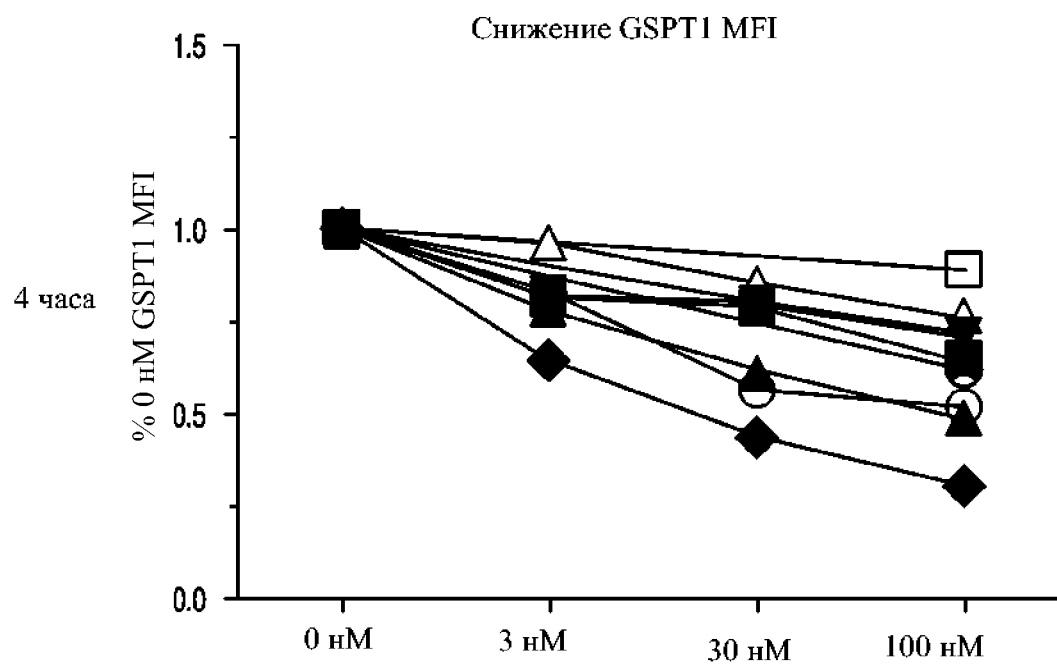
27. Способ по любому из пп. 21 - 26, где способ предусматривает измерение доли CD34+, CD15+ клеток, CD14+ клеток и/или CD11b+ клеток.

28. Способ по любому из пп. 21 - 27, где способ предусматривает измерение доли CD34+ клеток, и где сокращение доли CD34+ клеток по сравнению с долей CD34+ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

29. Способ по любому из пп. 21 - 27, где способ предусматривает измерение доли CD15+ клеток и/или CD14+ клеток, и где увеличение доли CD15+ клеток и/или CD14+ клеток по сравнению с долей CD15+ клеток и/или CD14+ клеток до введения соединения указывает на то, что субъект вероятно будет отвечать на лечение, предусматривающее соединение.

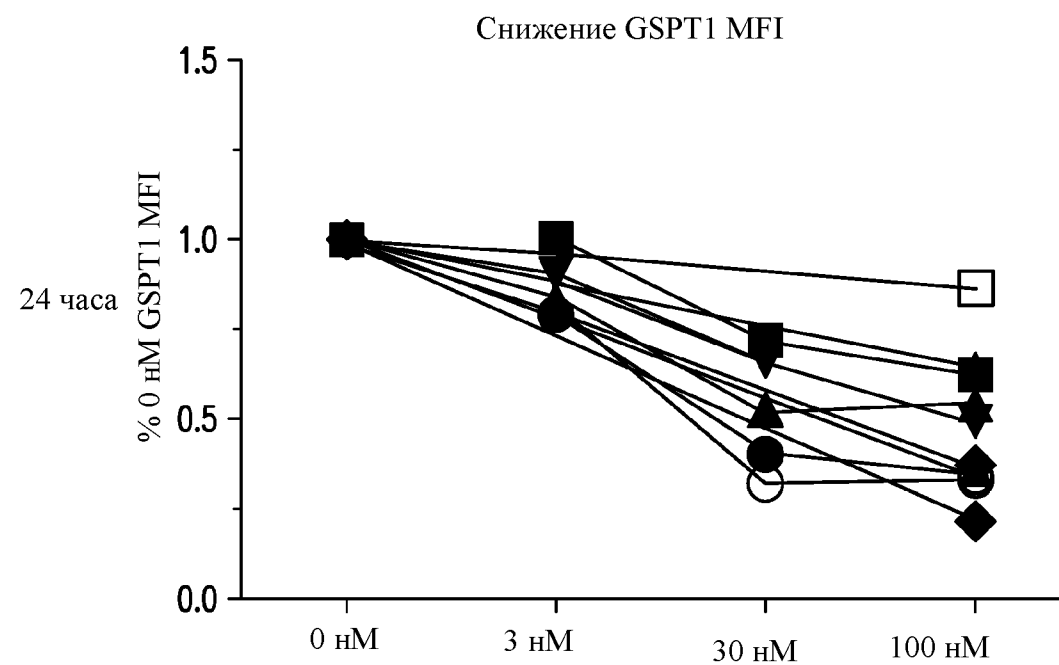
30. Способ по любому из пп. 1 - 29, где AML является невосприимчивым или устойчивым.

31. Способ по любому из пп. 1 - 29, где AML устойчив к лечению с применением одного или нескольких агентов, выбранных из группы, состоящей из даунорубицина, цитарабина (ага-С) и гемтузумаб озогамицина или устойчив к химиотерапии.



ID пациента	LSC17
590	высокий
110500	nd
90191	nd
110770	высокий
110102	высокий
100348	низкий
90668	низкий
120860	низкий
100753	высокий
120706	высокий

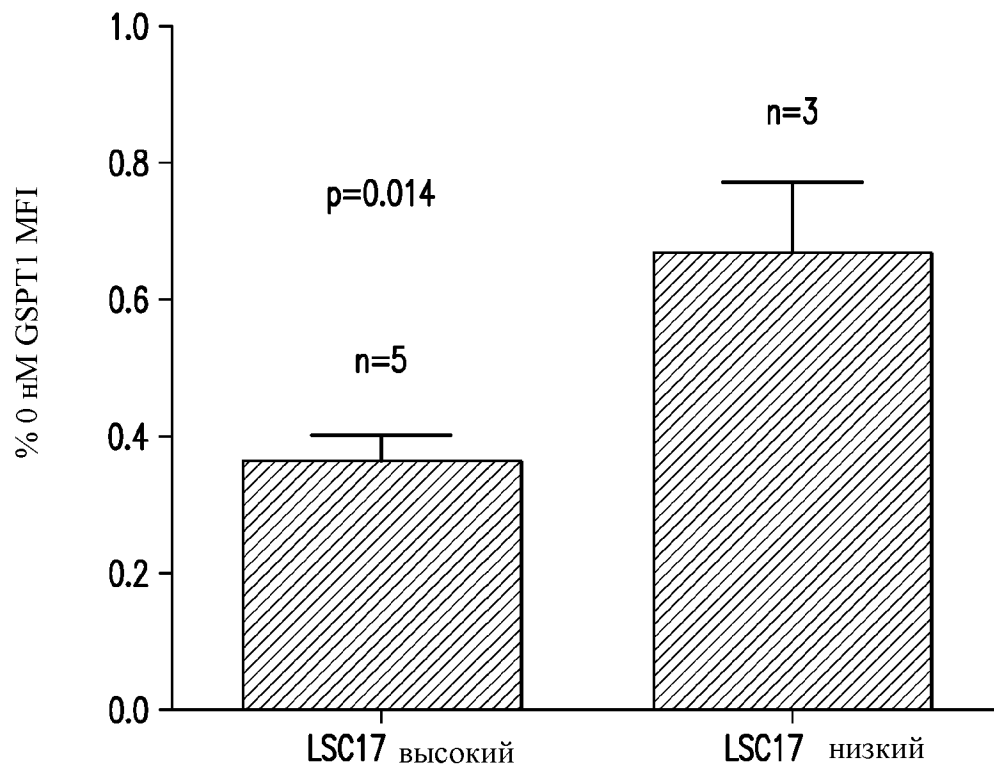
Фиг.1А



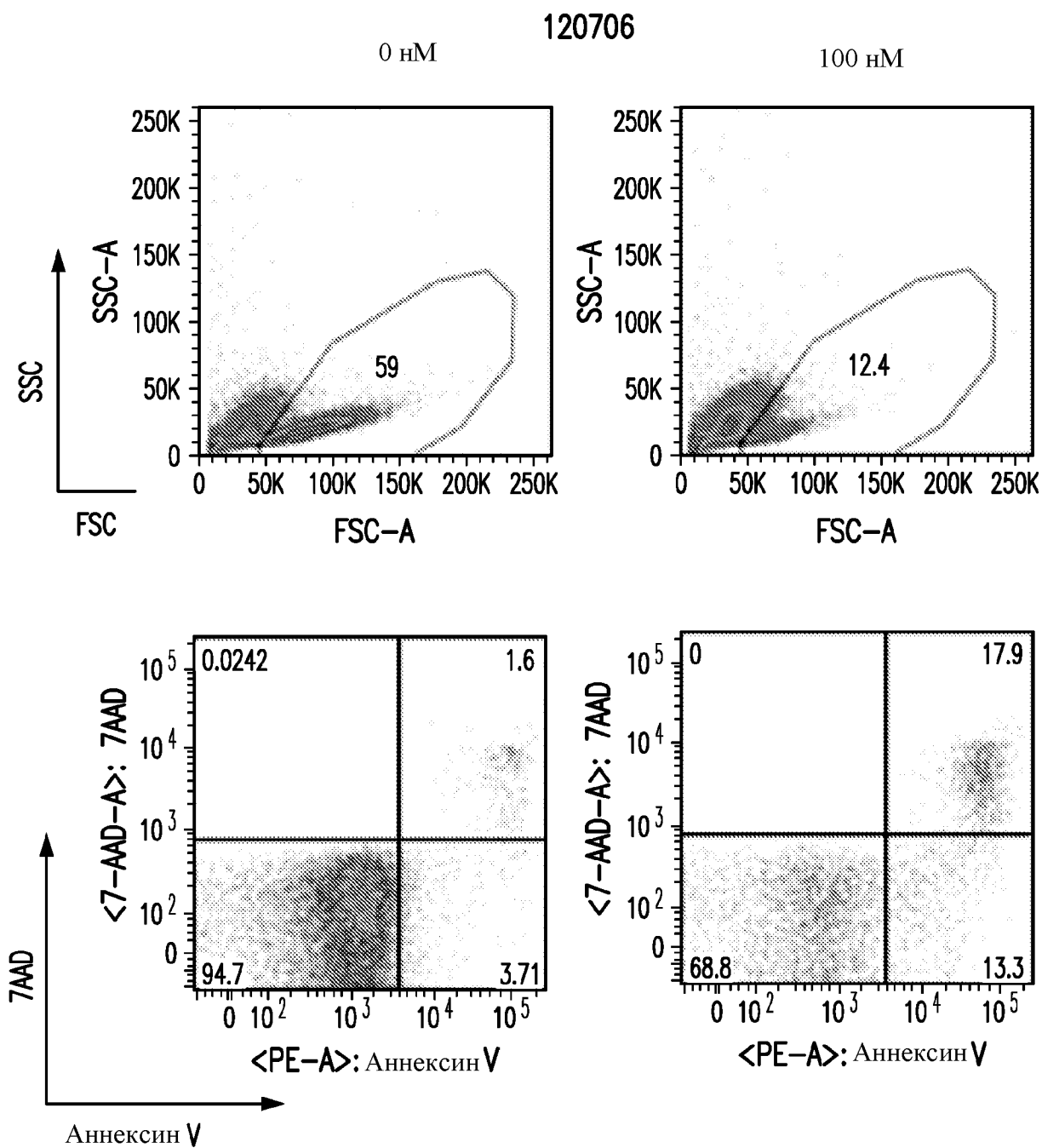
Фиг.1В

3/70

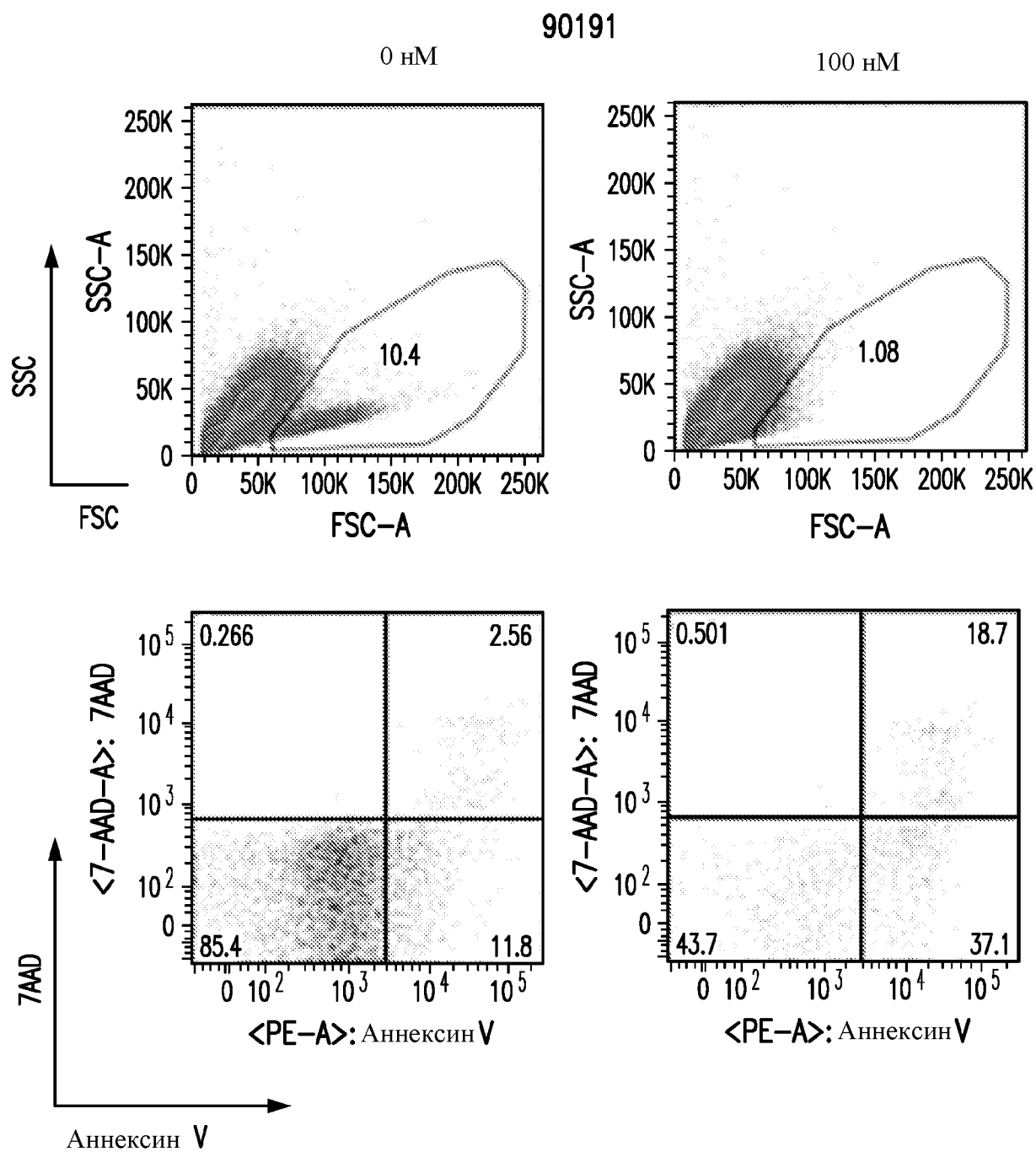
Разрушение GSPT1 при 100 нМ
24 часа



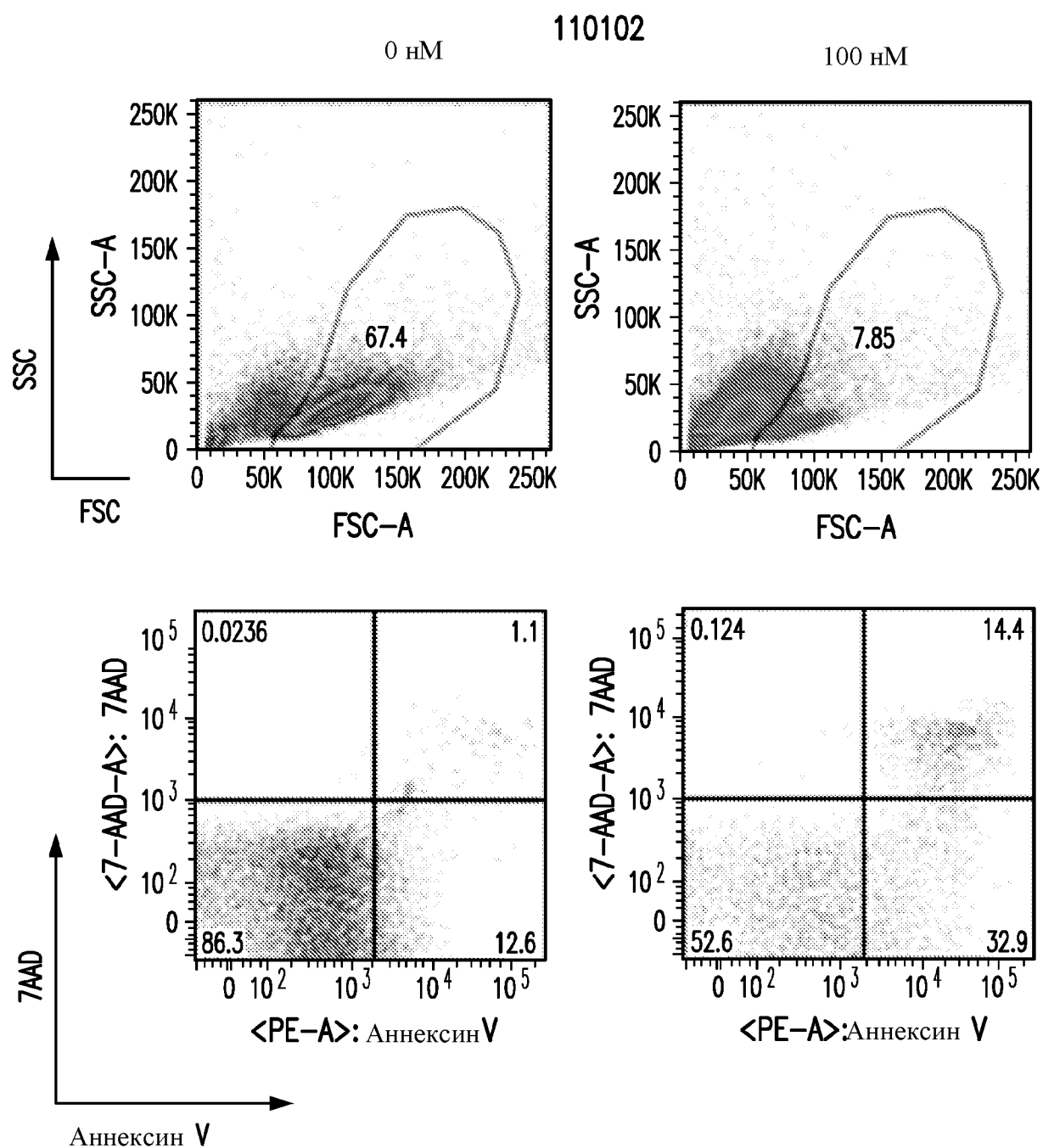
Фиг.1С



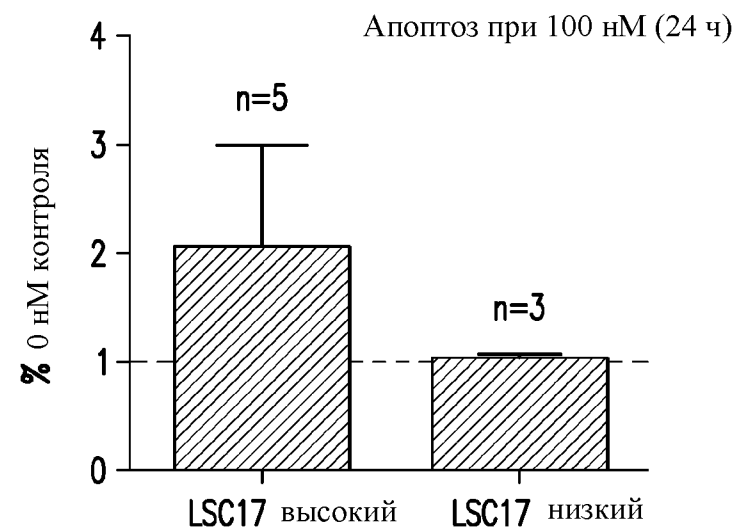
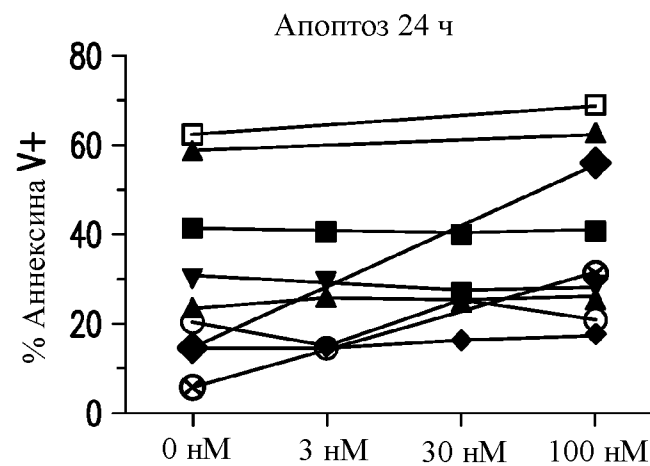
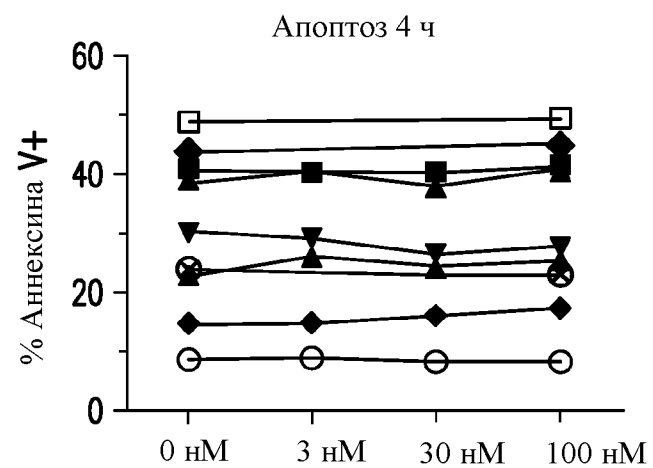
Фиг.2А



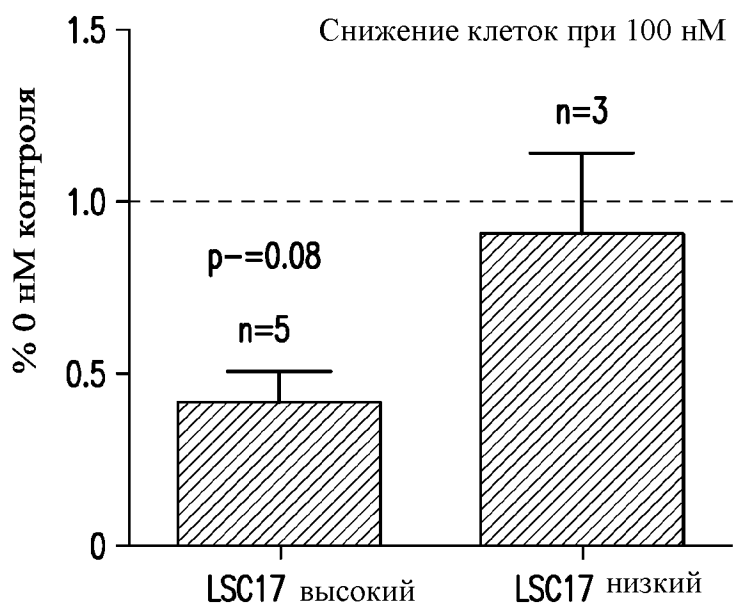
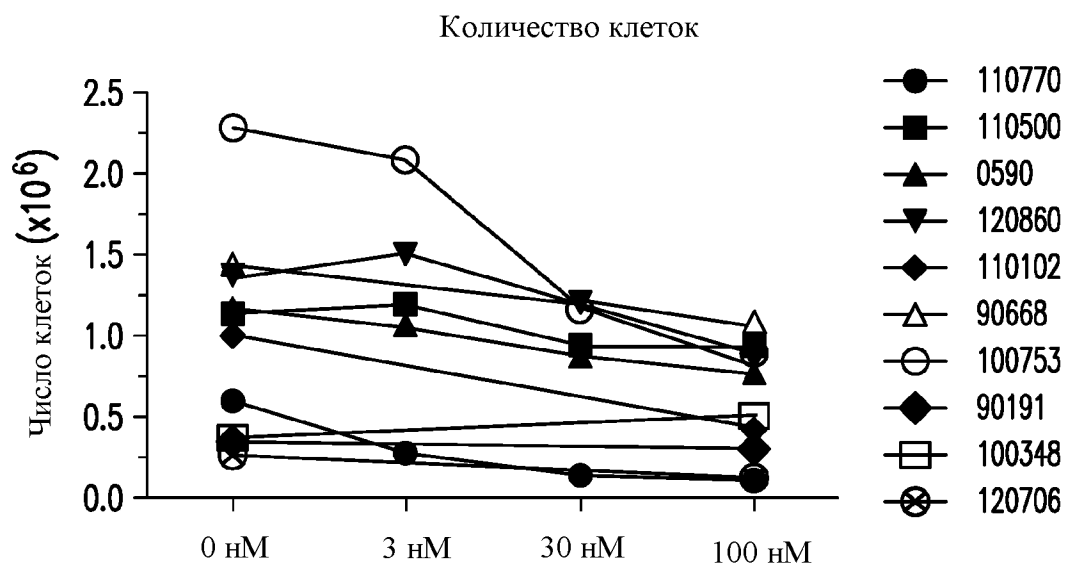
Фиг.2А (продолжение)



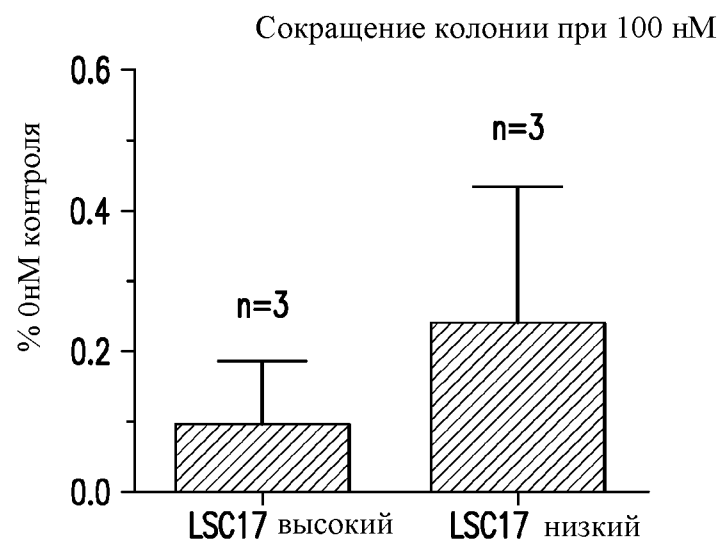
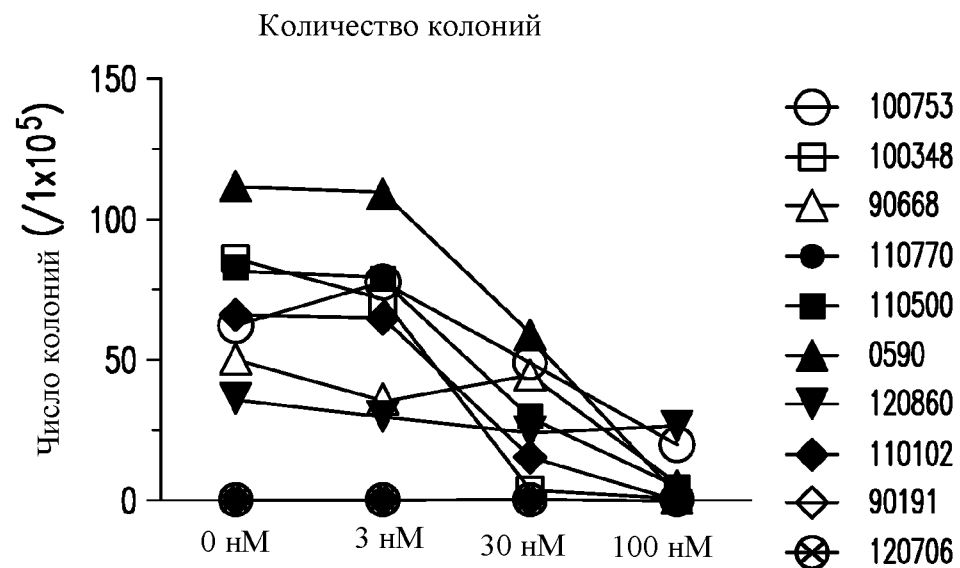
Фиг.2А (продолжение)



Фиг.2В

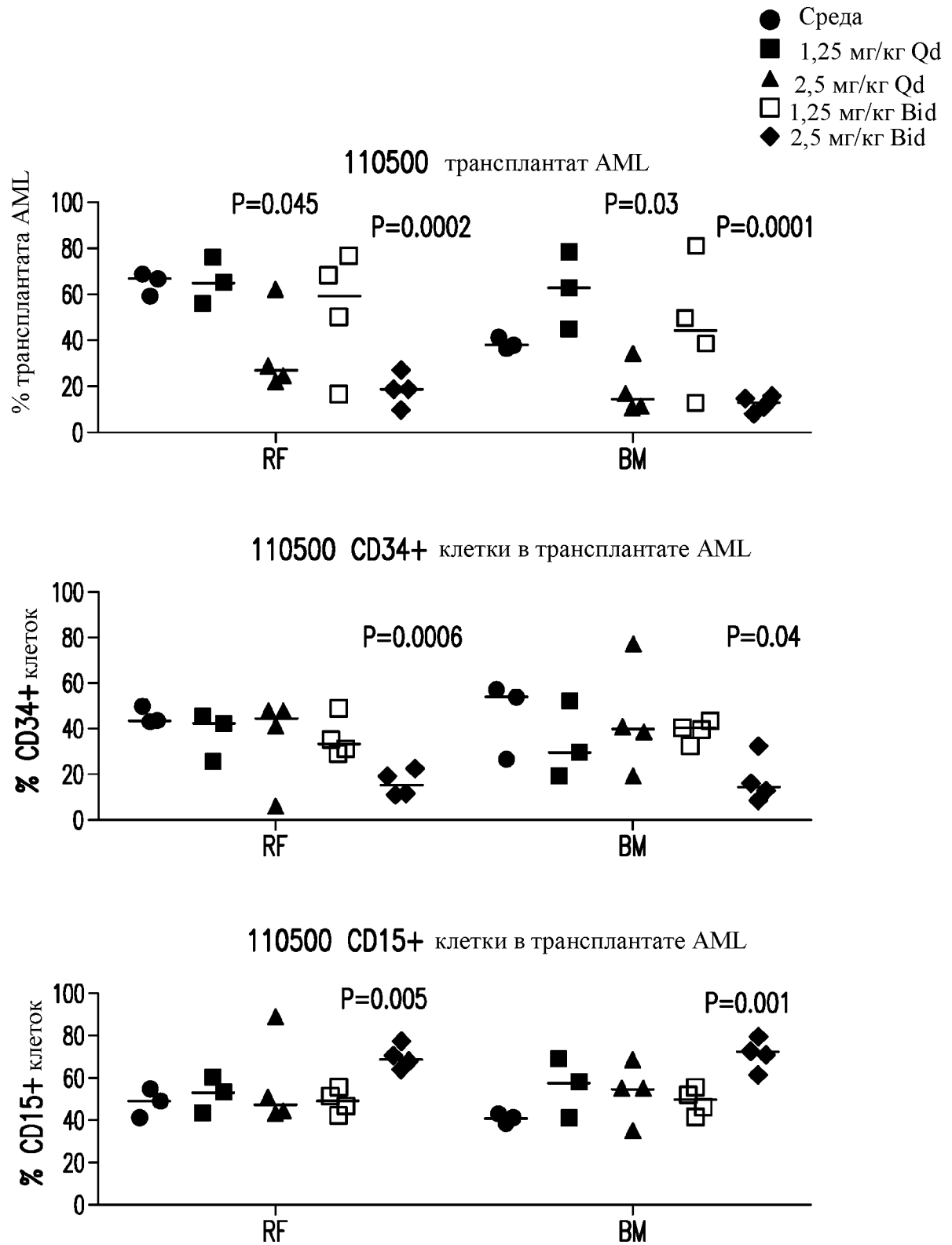


Фиг.2С

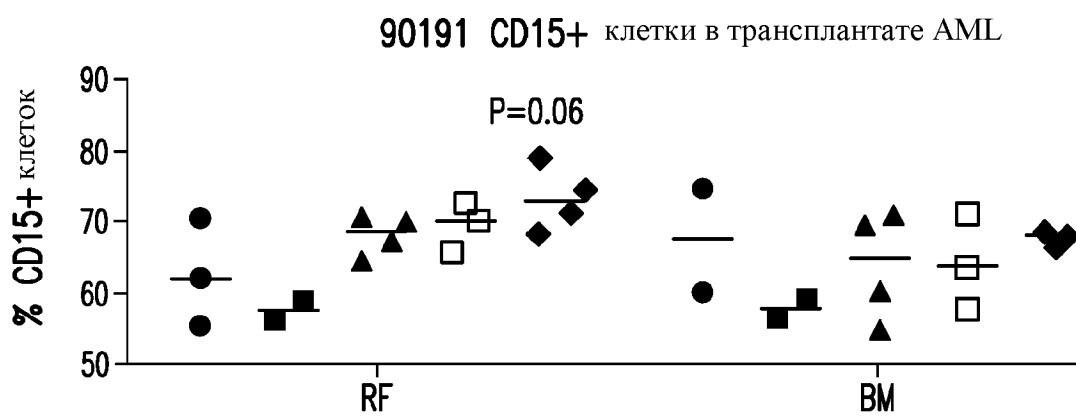
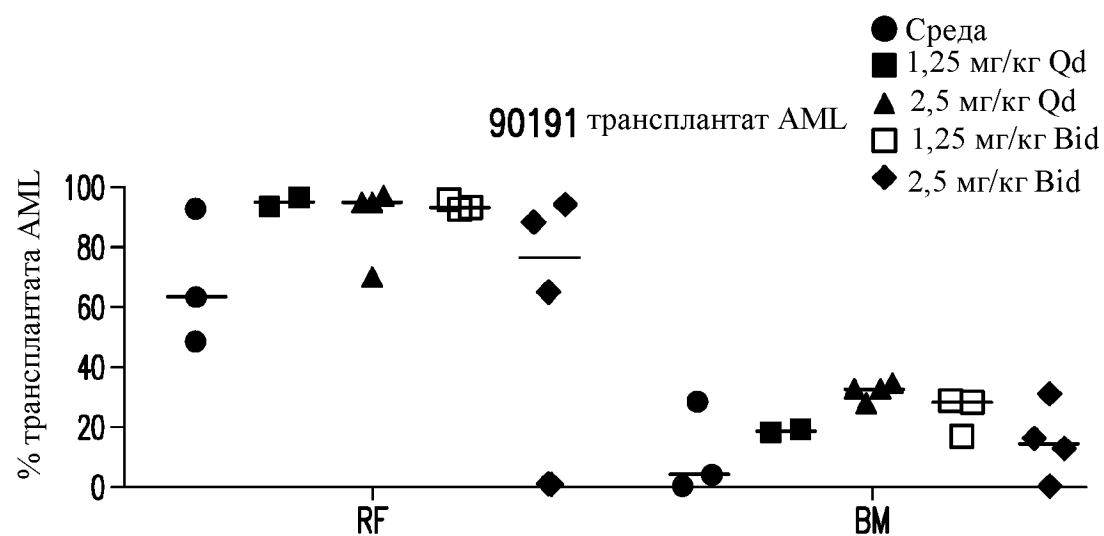


ID пациента	LSC17
590	высокий
110500	nd
90191	nd
110770	высокий
110102	высокий
100348	низкий
90668	низкий
120860	низкий
100753	высокий
120706	высокий

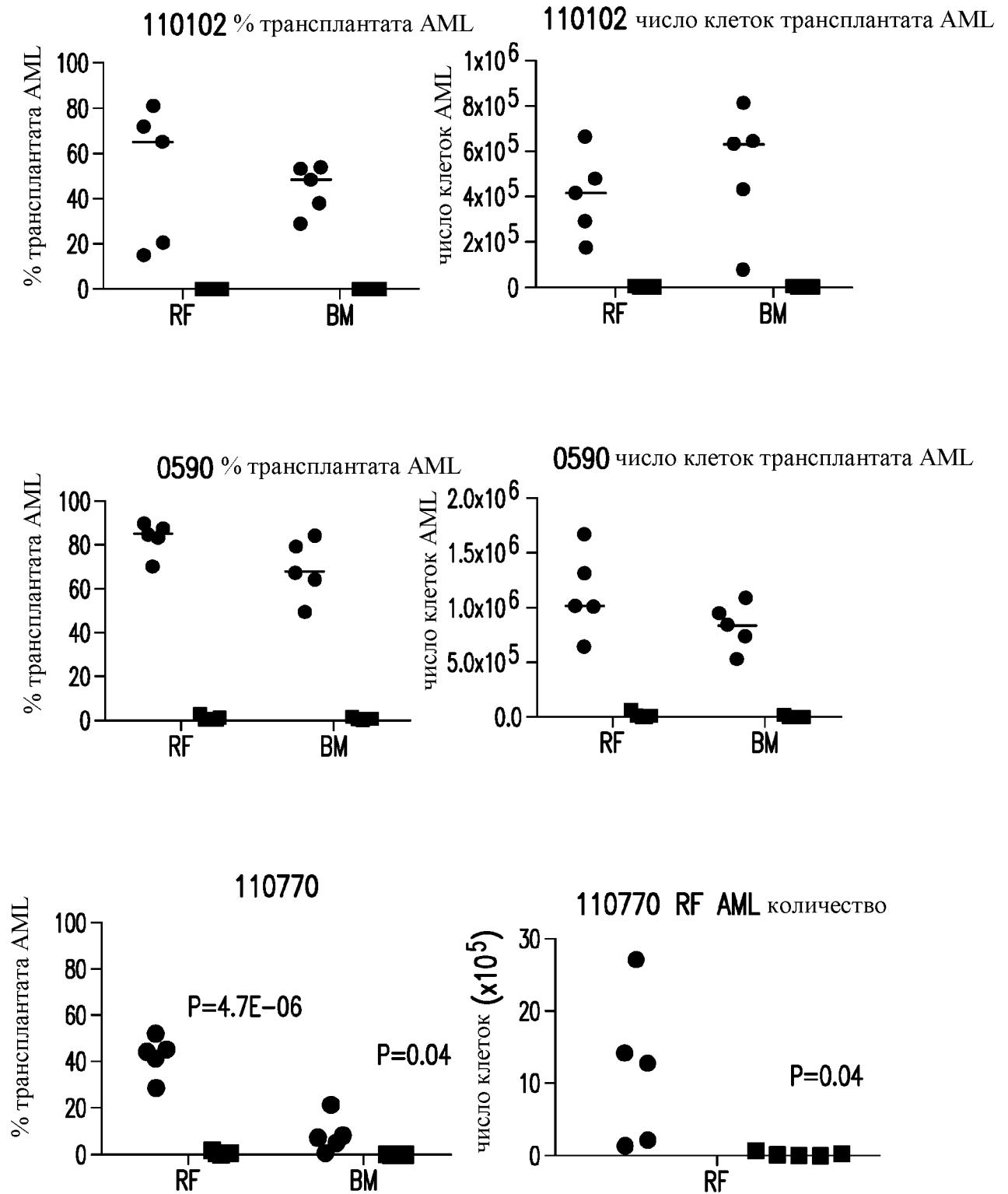
Фиг.3



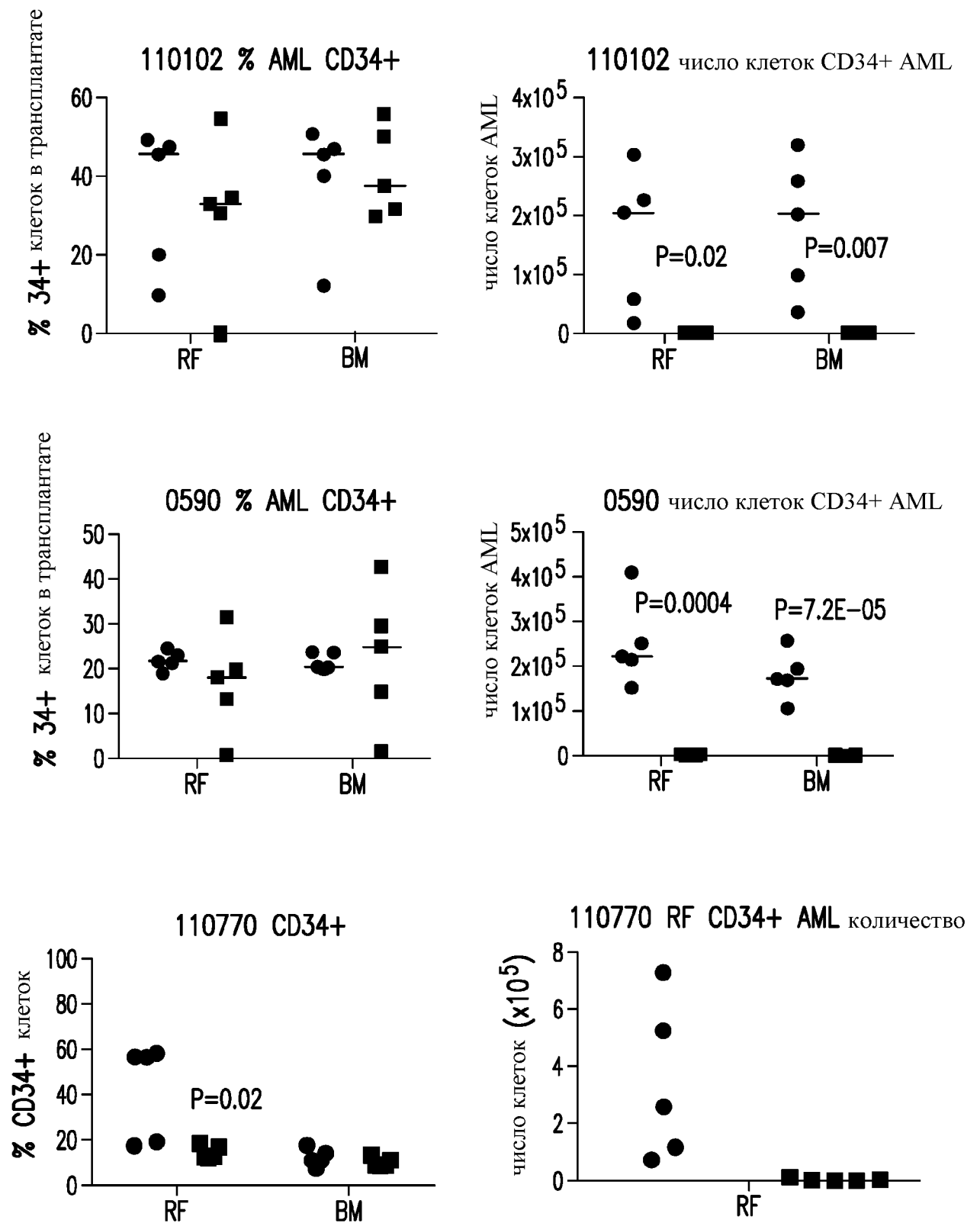
Фиг.4



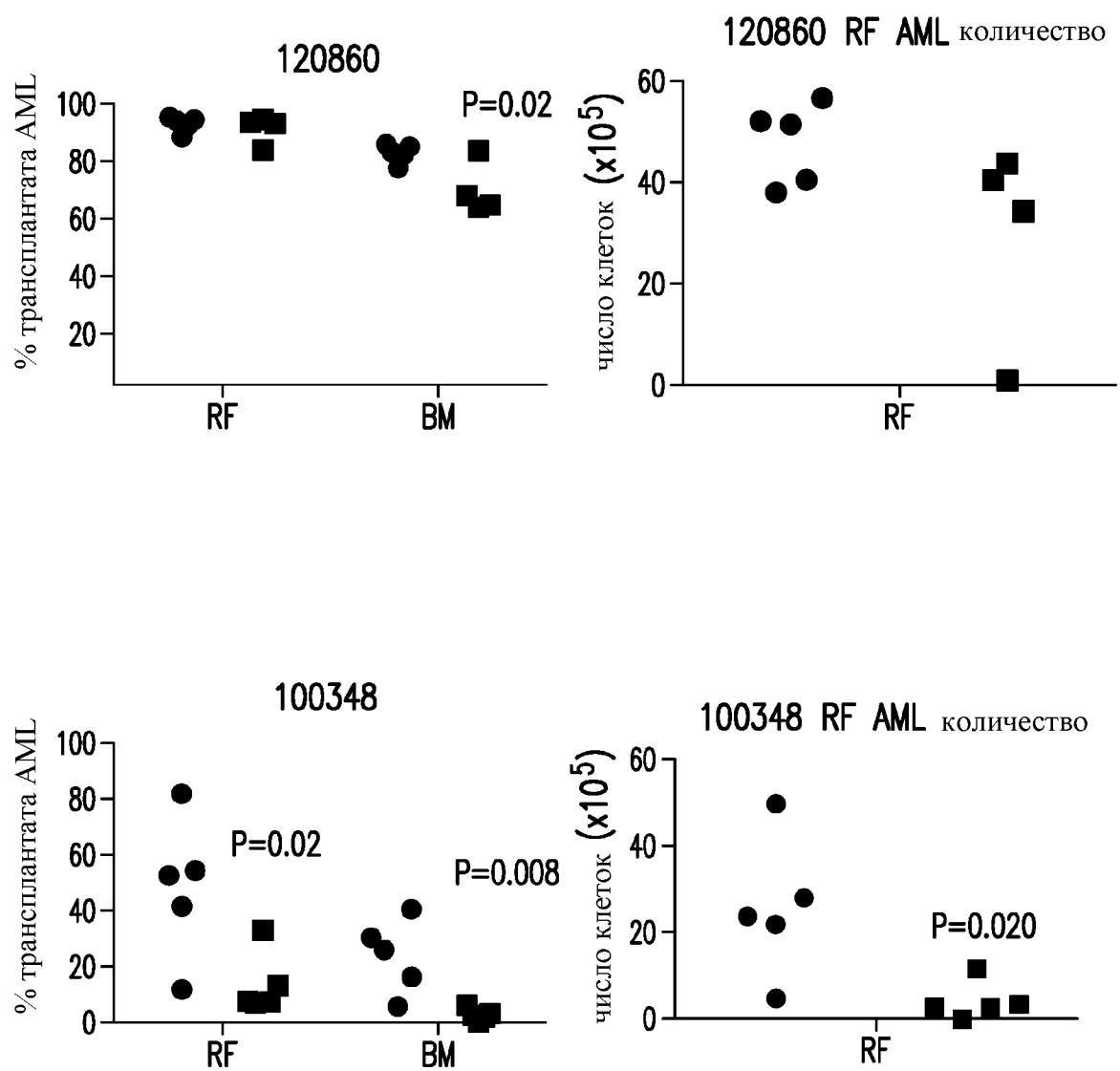
Фиг.4 (продолжение)



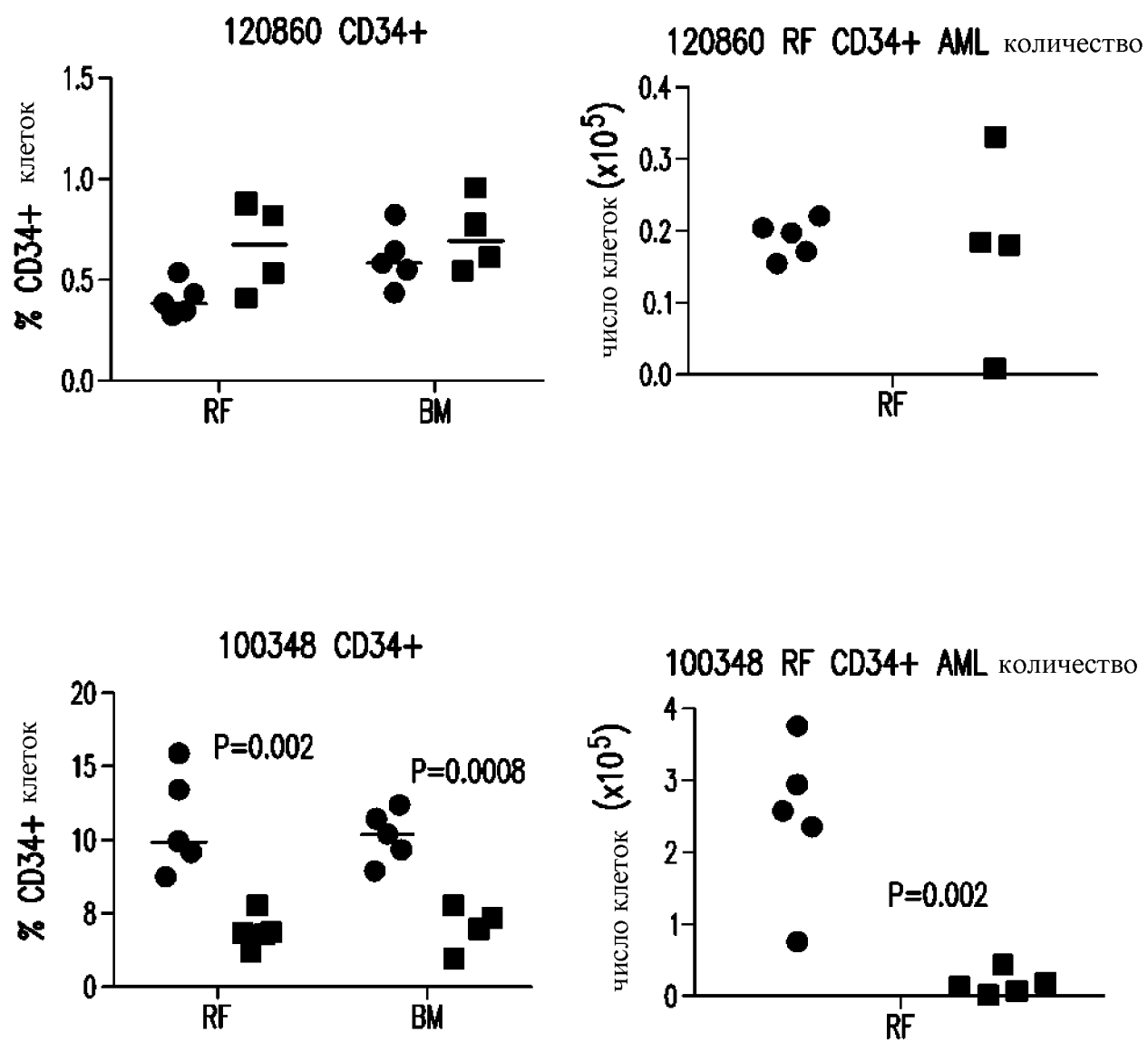
Фиг.5



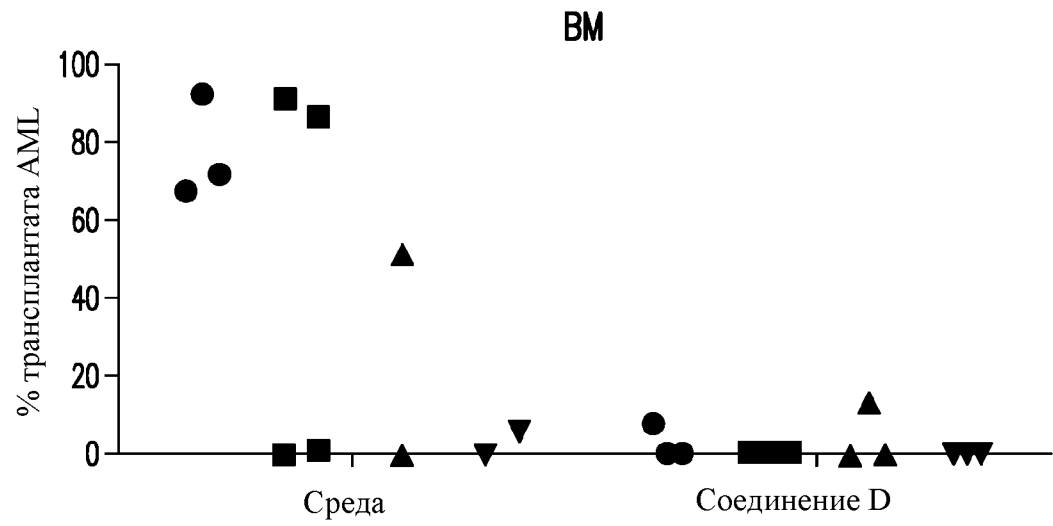
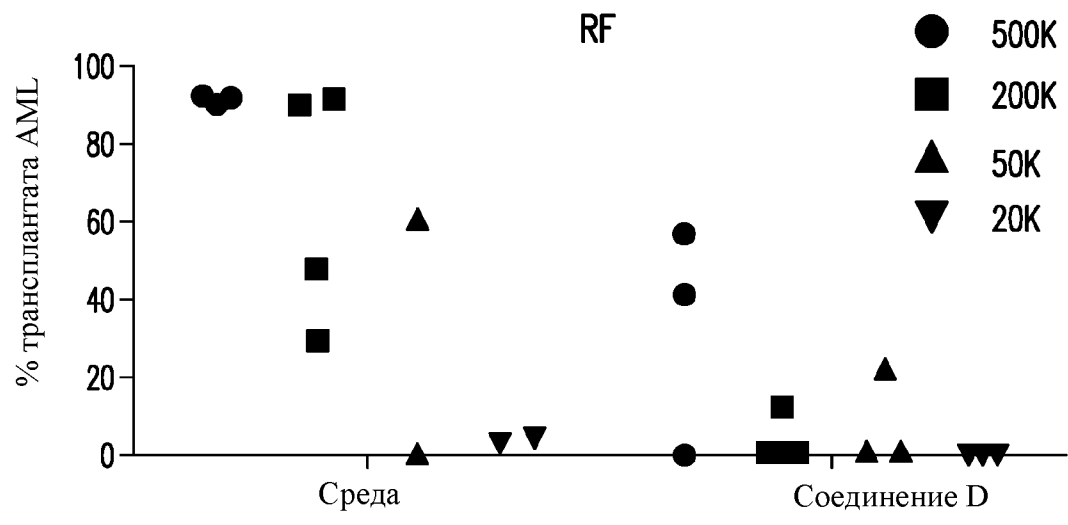
Фиг.5 (продолжение)



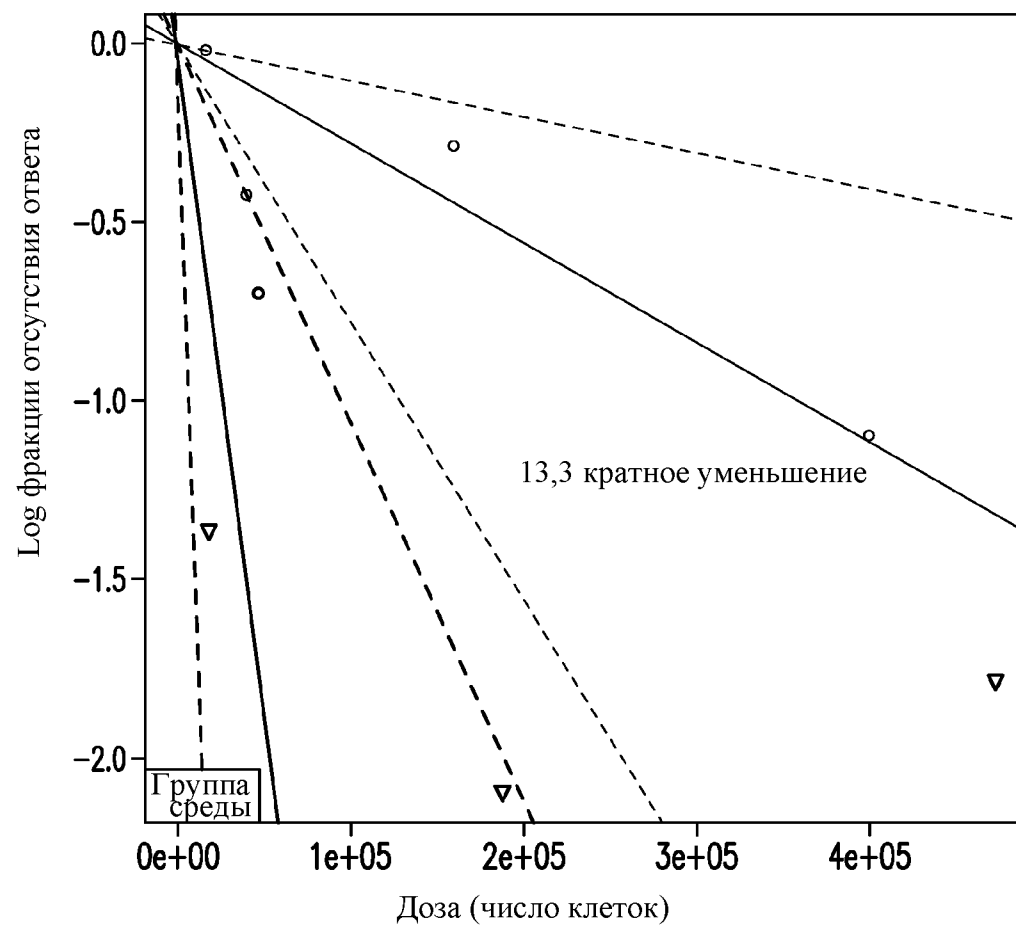
Фиг.6



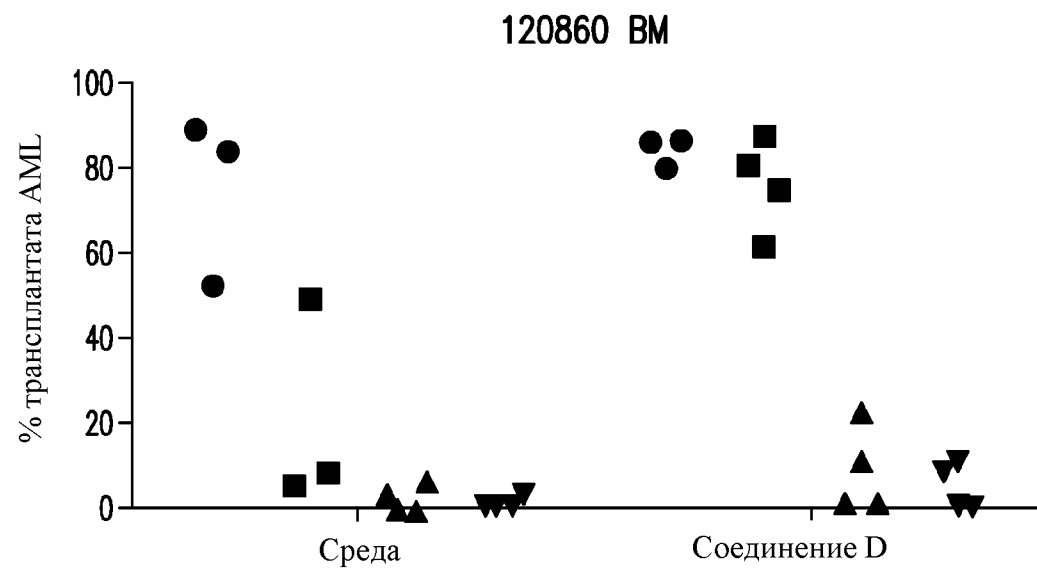
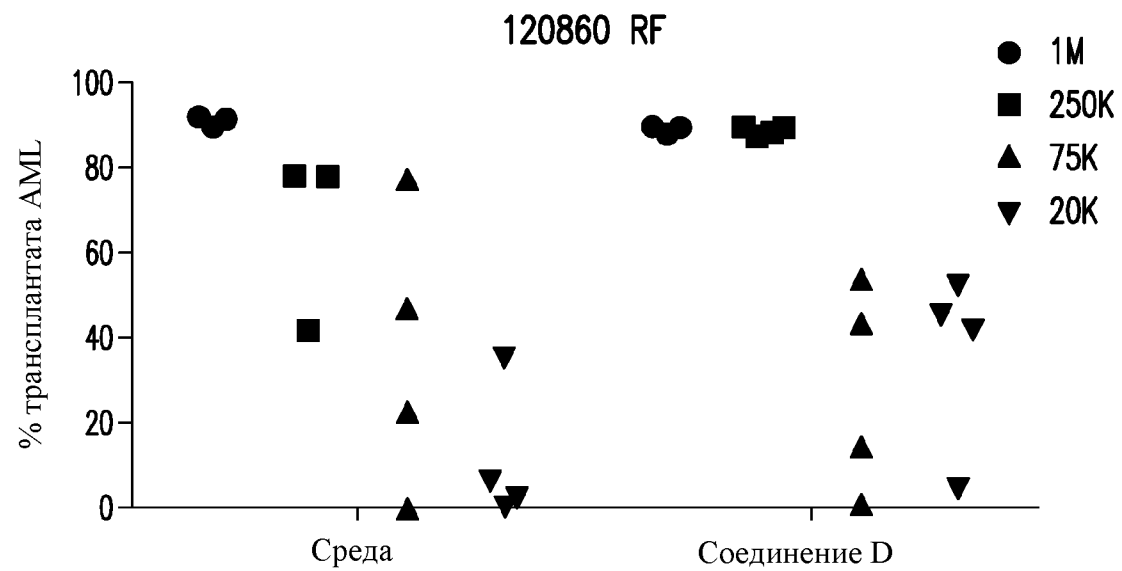
Фиг.6 (продолжение)



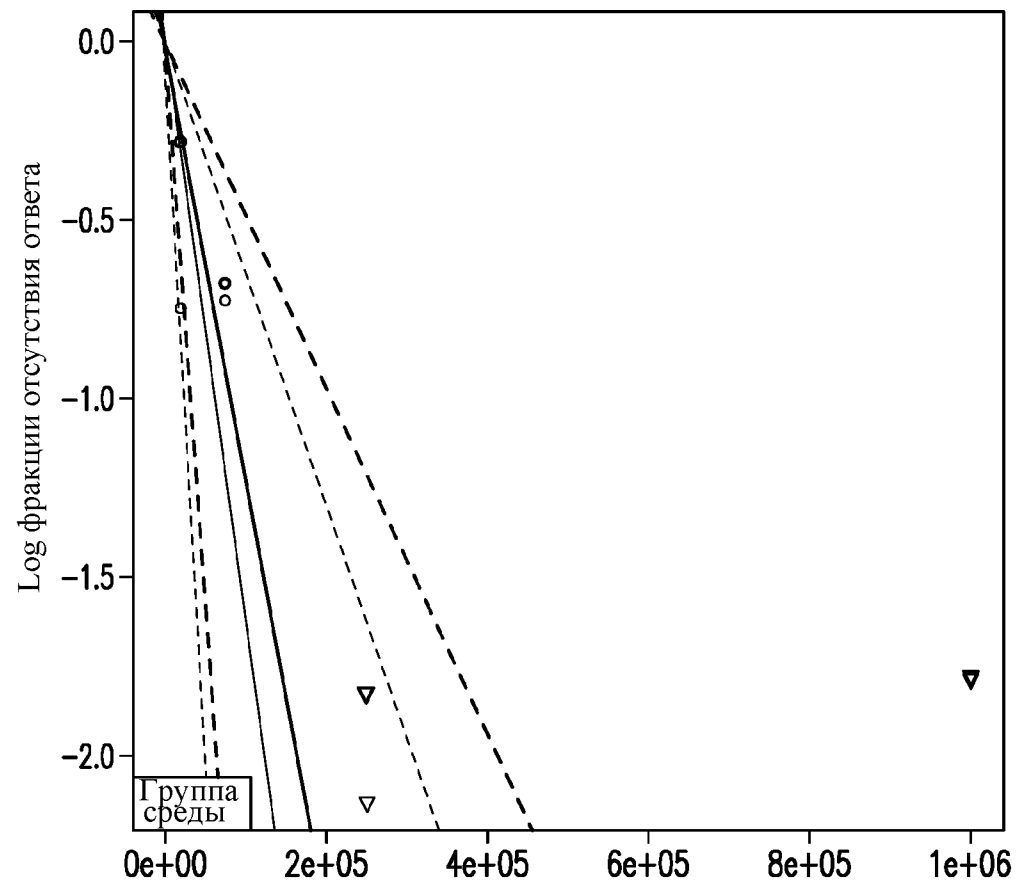
Фиг.7А



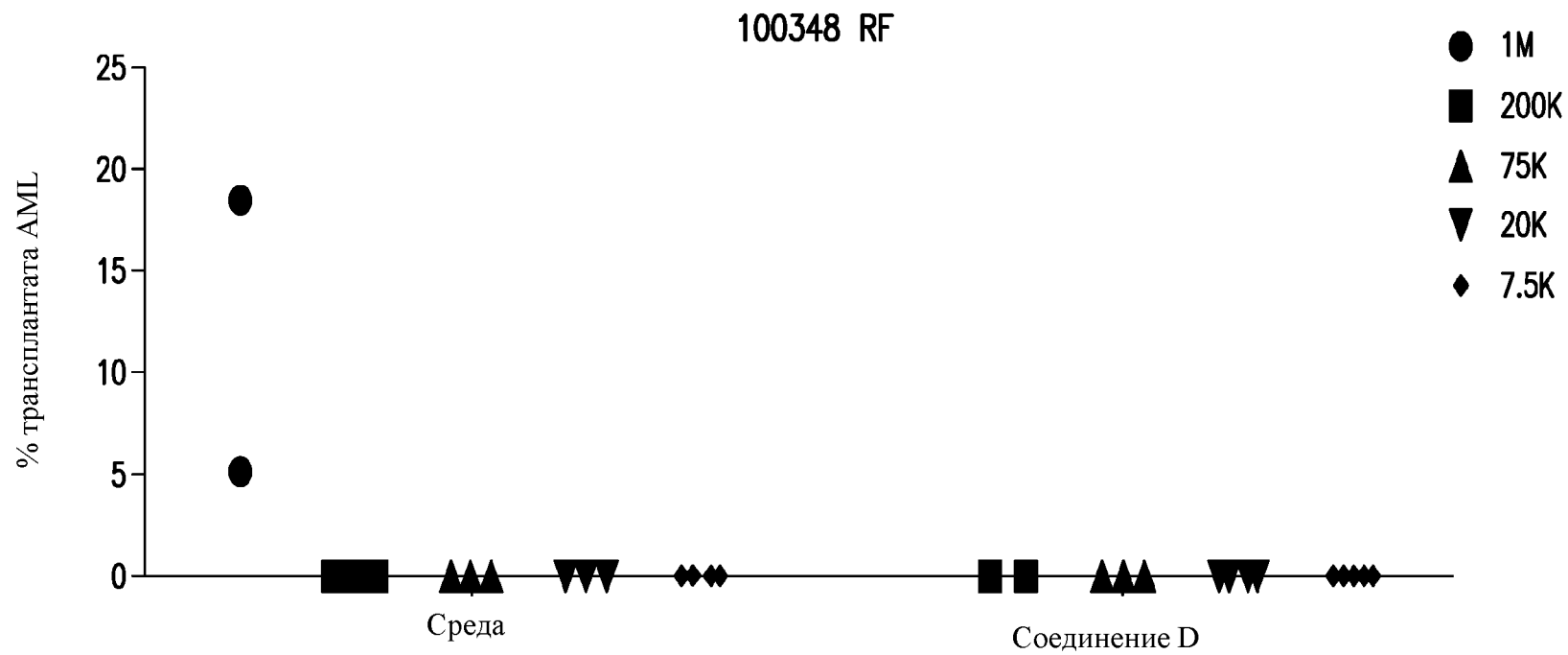
Фиг. 7А (продолжение)



Фиг. 7В



Фиг. 7В (продолжение)

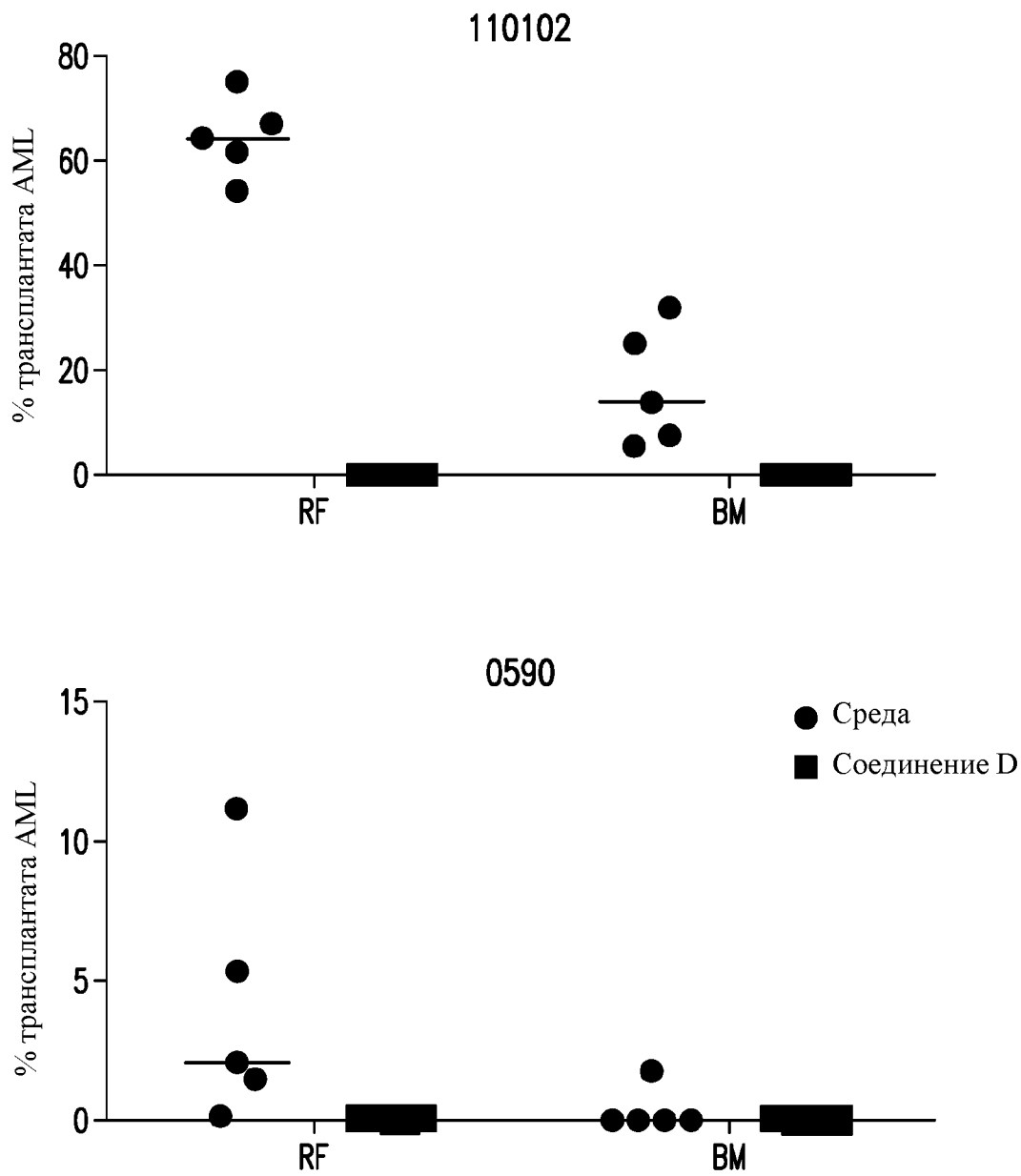


Фиг.7С

D. Число трансплантированных клеток AML

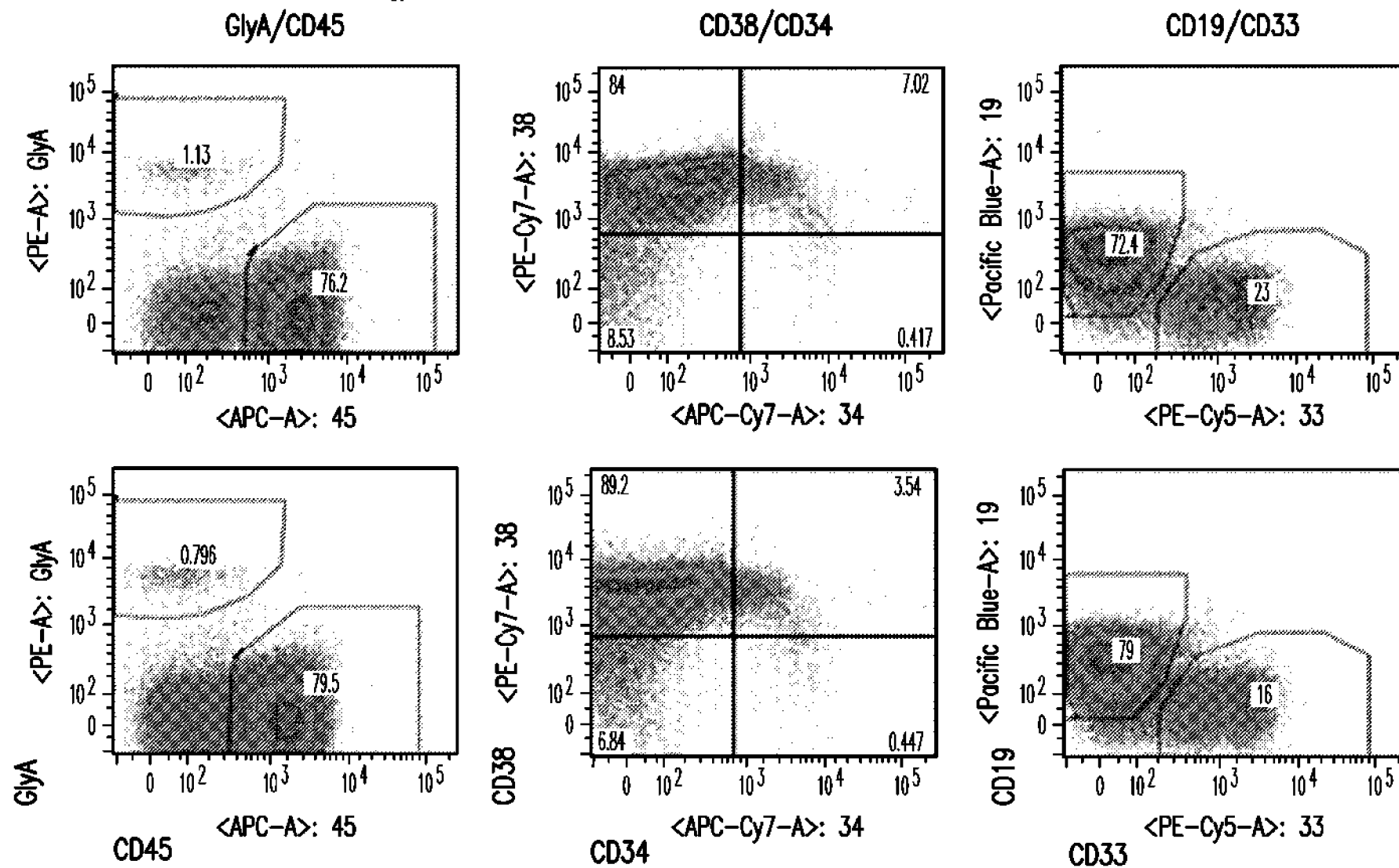
ID образца	% CD45+	Клетки в общем	AML клетки/мышь
		$\times 10^6$	$\times 10^6$
590 среда	81.7	36.03	5.89
590 Соединение D	0.425	52.35	0.04
110102 среда	47.2	36.03	3.40
110102 Соединение D	0.127	65.86	0.02
110770 среда	14.7	41.09	1.21
110770 Соединение D	0.402	55.73	0.04

Фиг. 7D

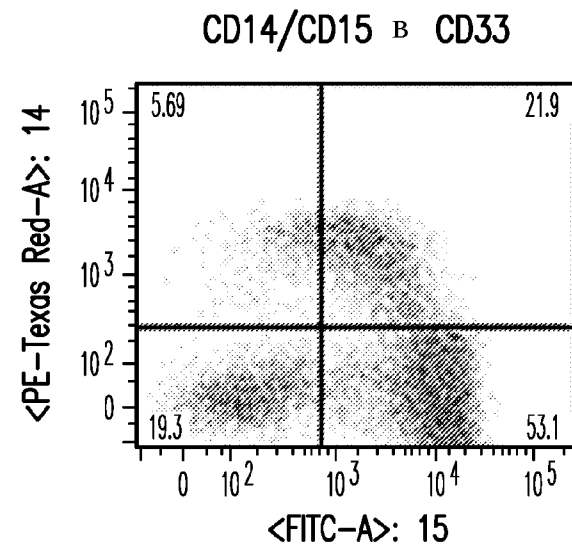
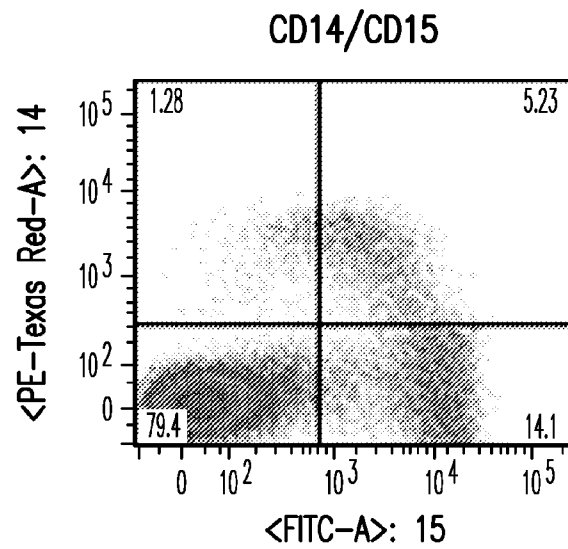


Фиг.7Е

А. Иллюстративная стратегия гейтирования для среды

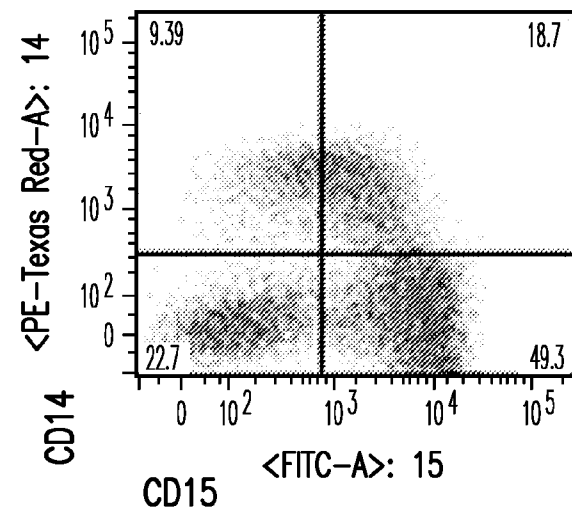
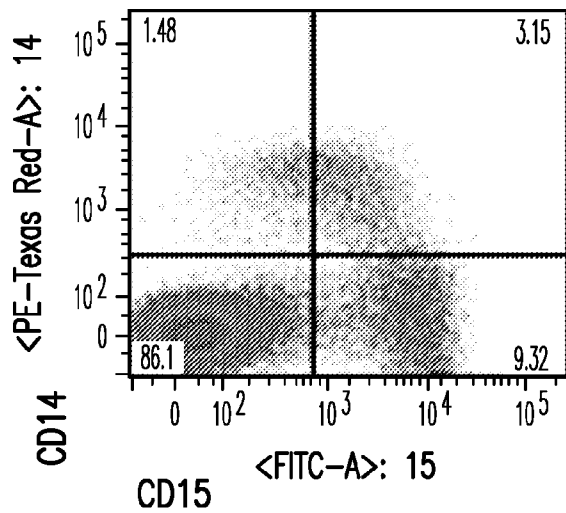


Фиг.8А



RF

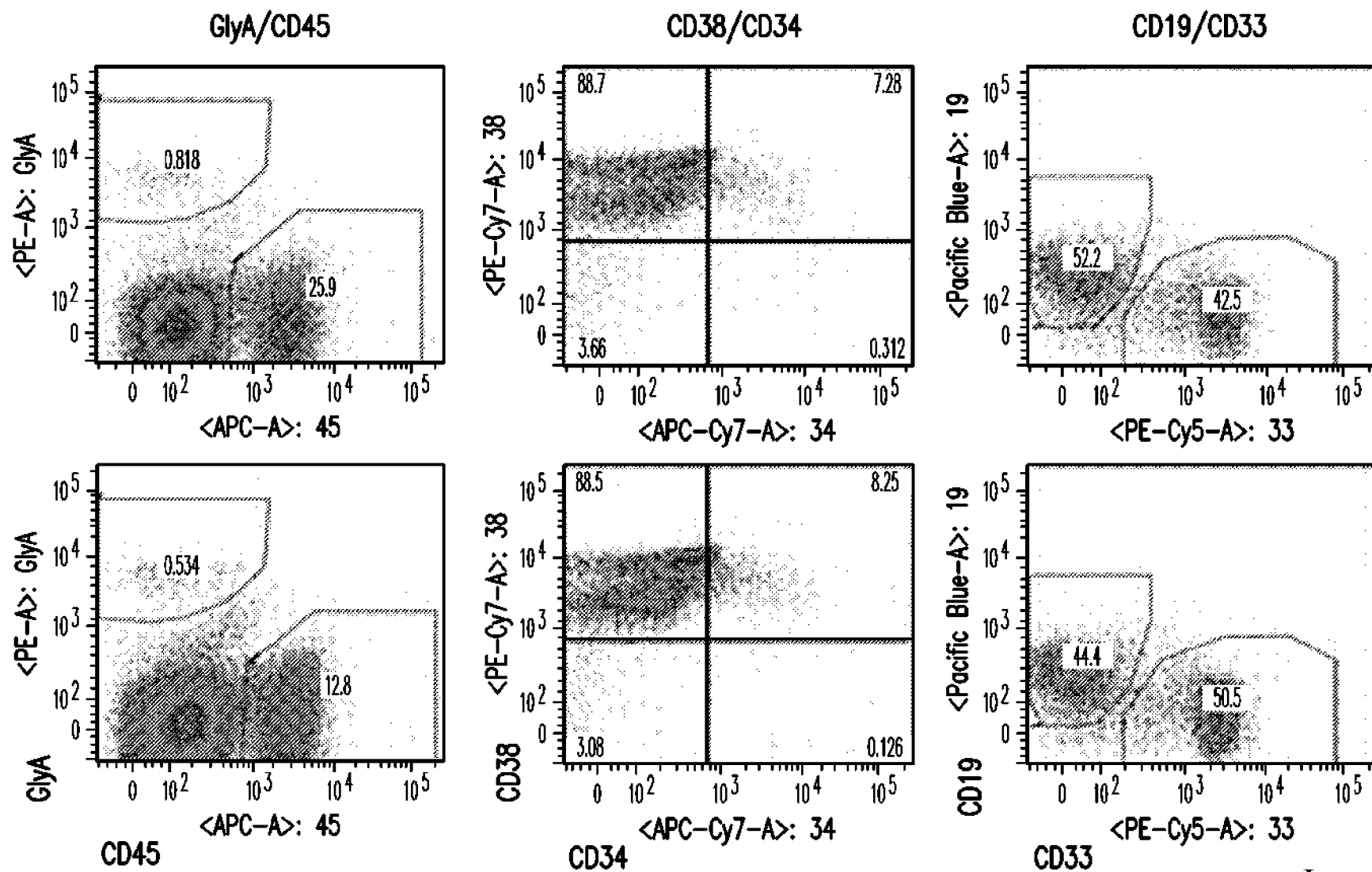
мышь 1
(среда)



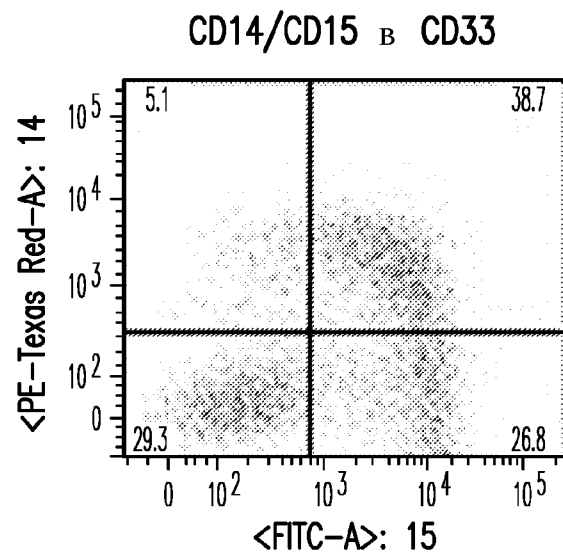
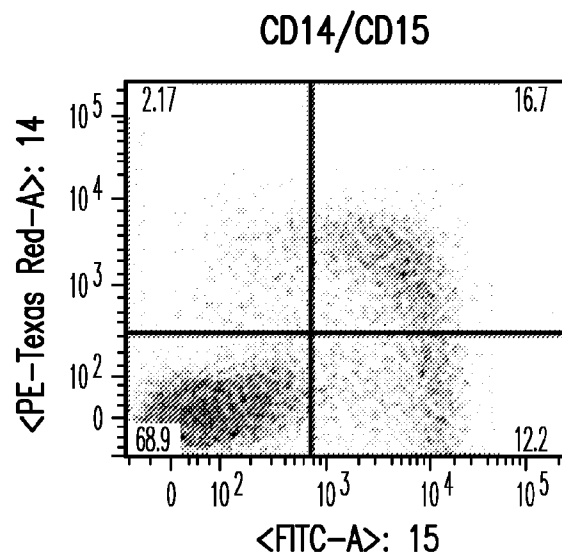
BM

Фиг.8А (продолжение)

В. Иллюстративная стратегия гейтирования для Соединения D

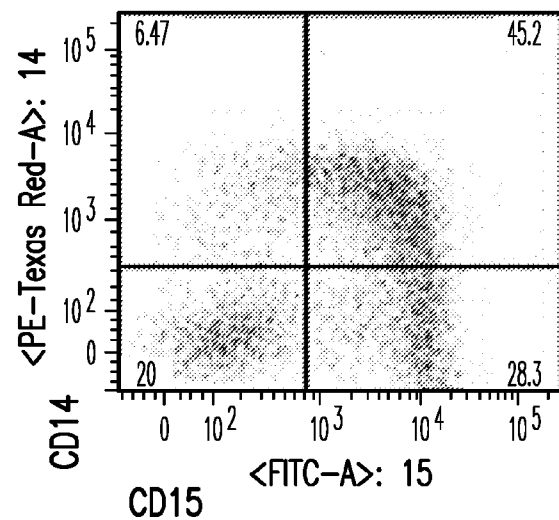
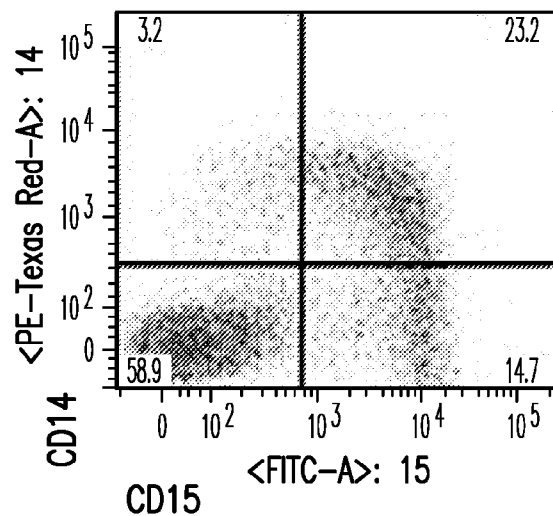


Фиг. 8В



RF

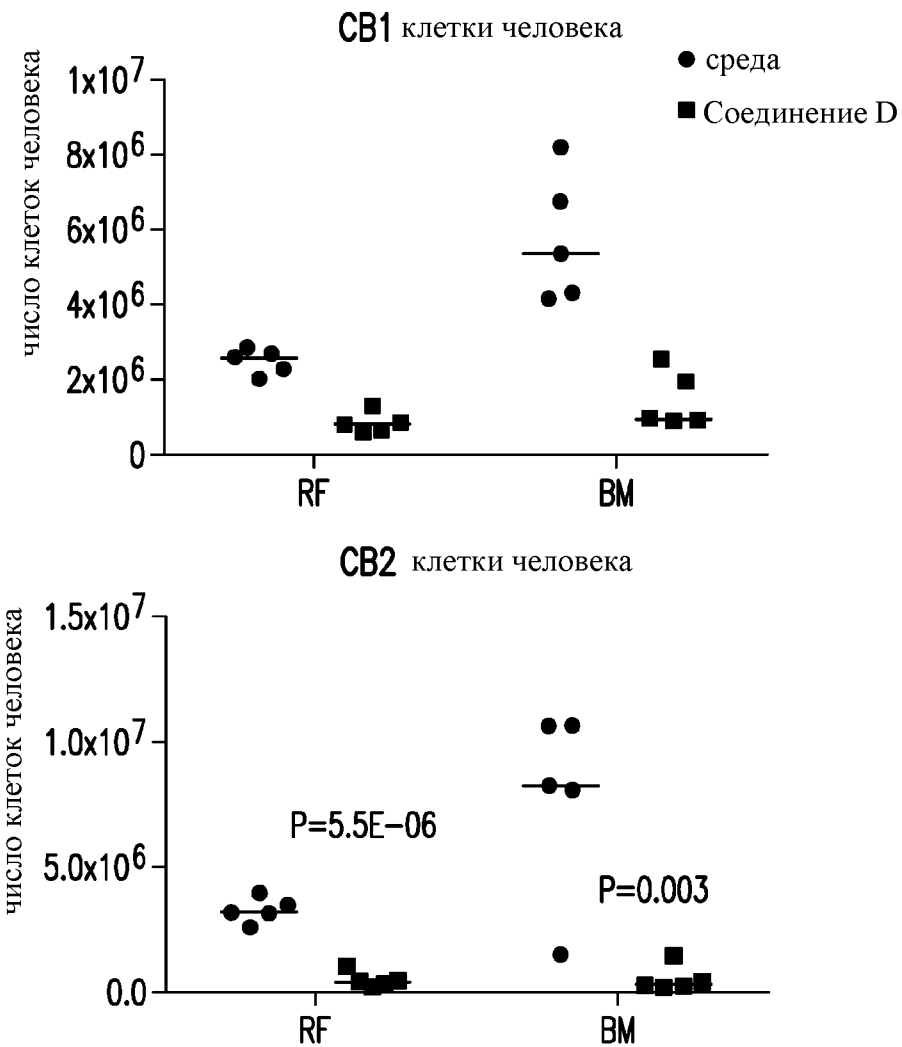
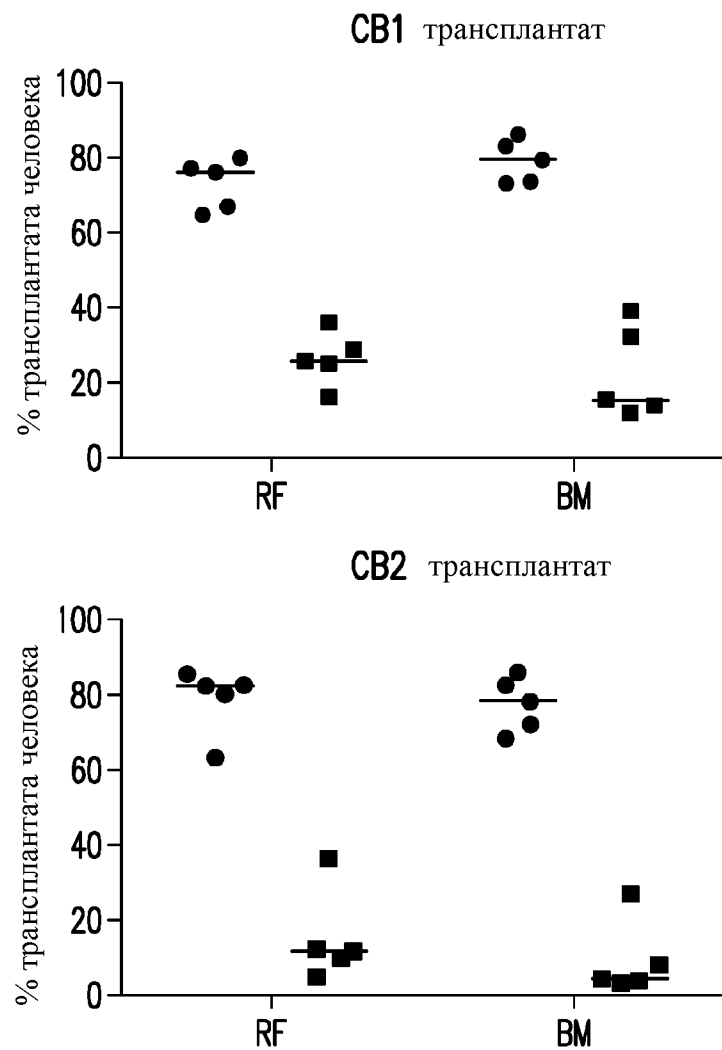
мышь 6
(Соединение D)



BM

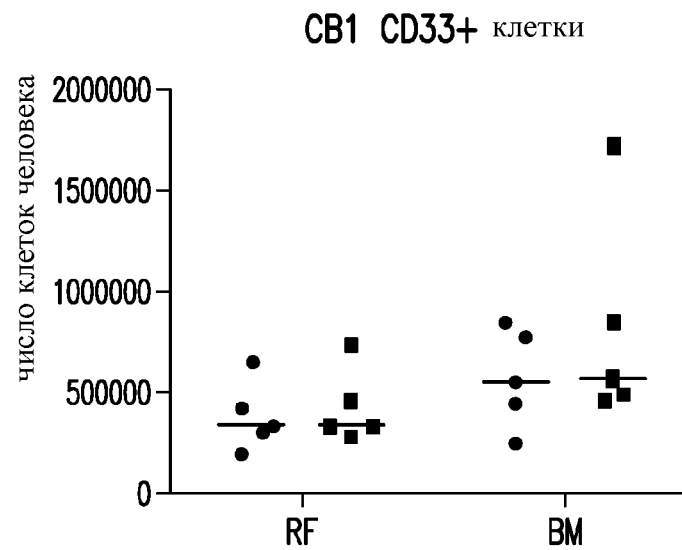
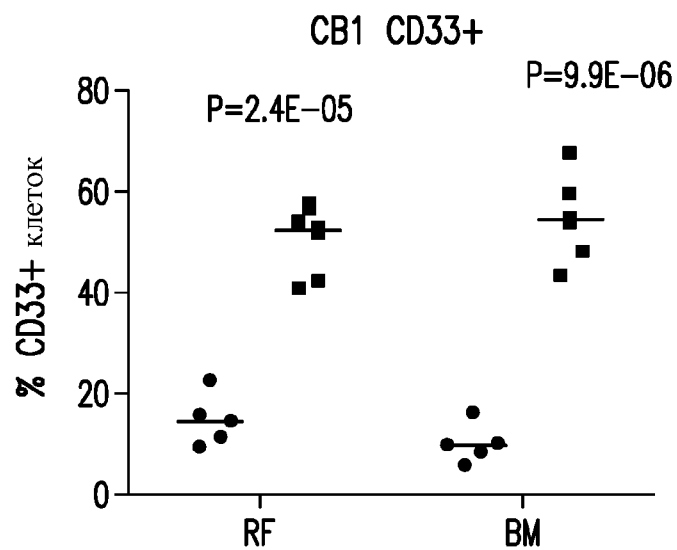
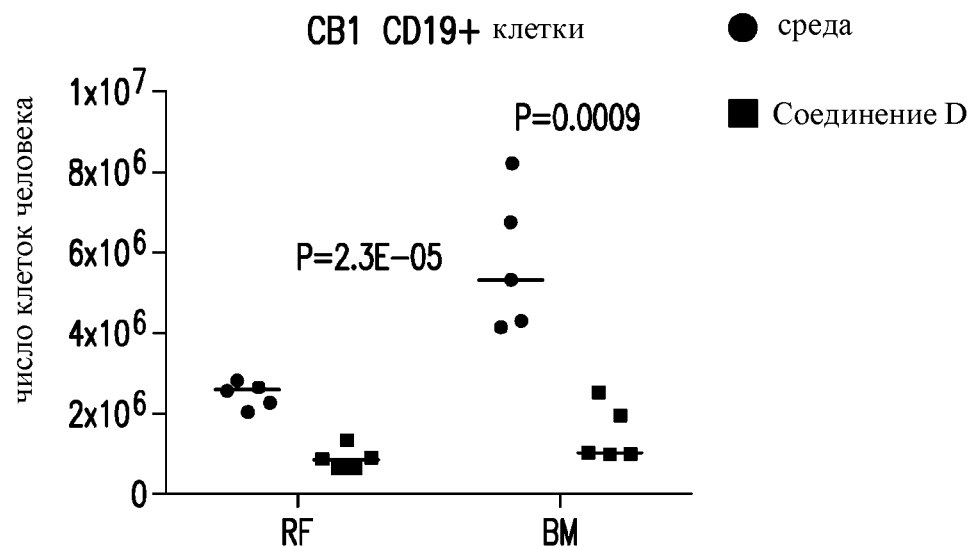
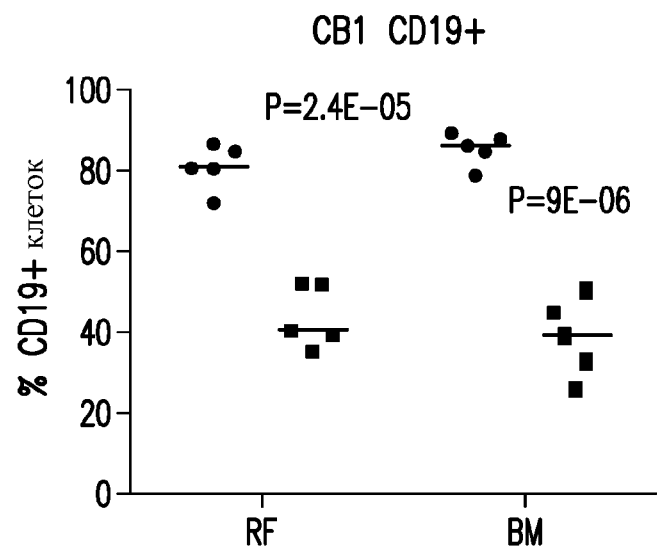
Фиг.8В (продолжение)

A. Трансплантат пуповинной крови



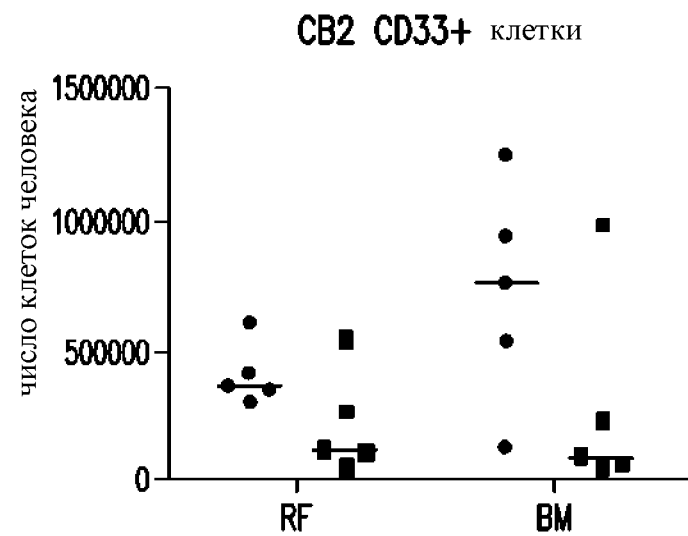
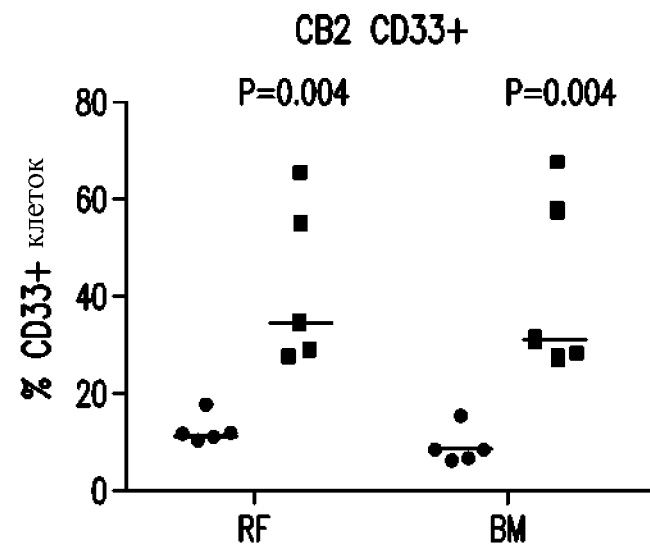
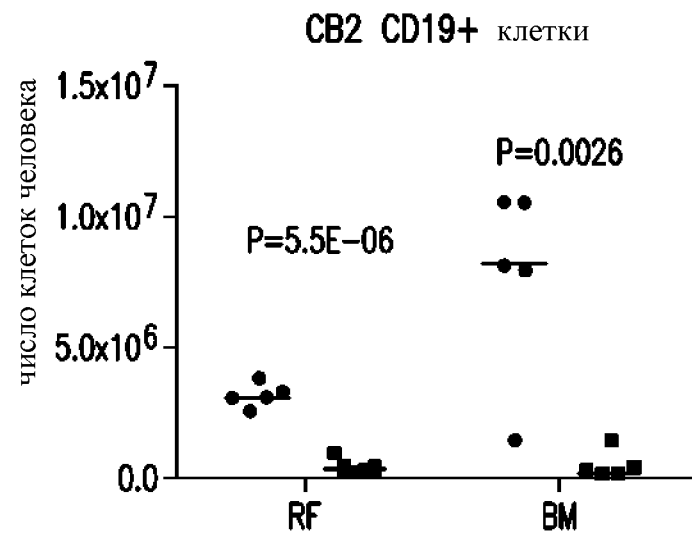
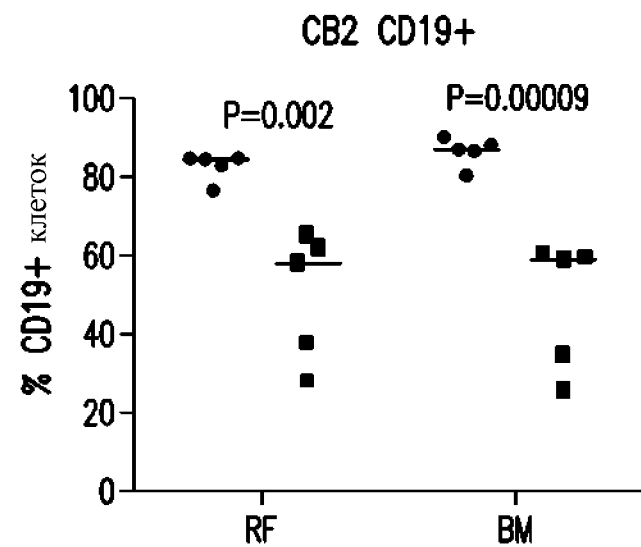
Фиг.9А

В. CD19+ и CD33+



28/70

Фиг.9В

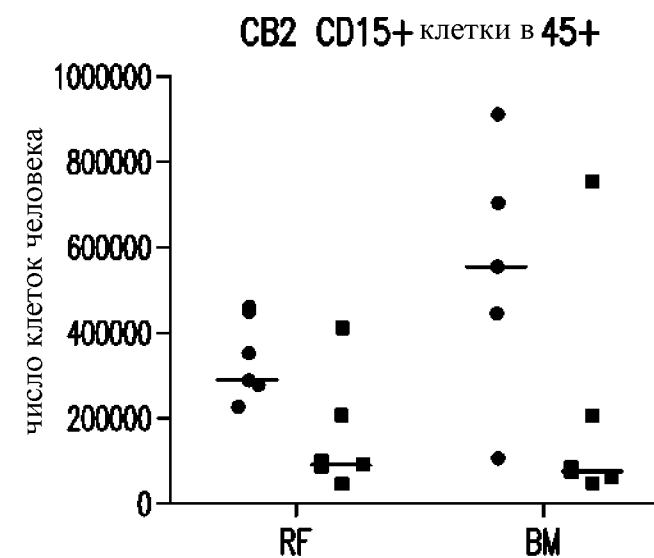
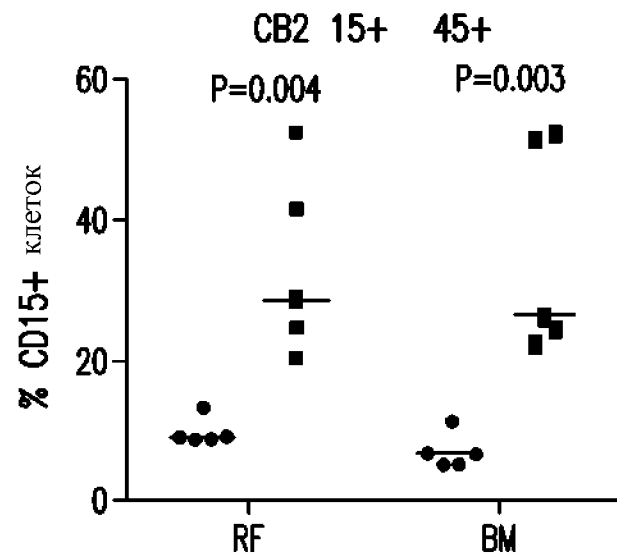
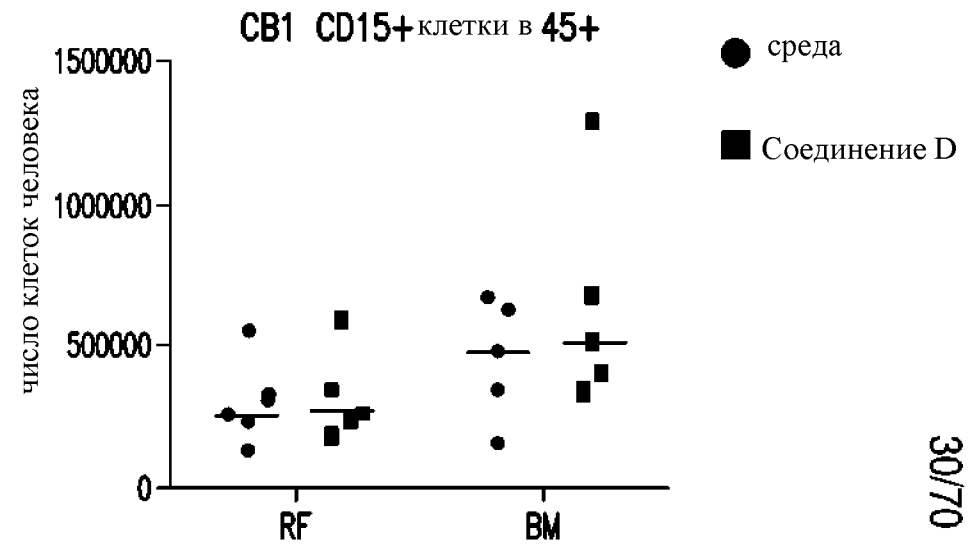
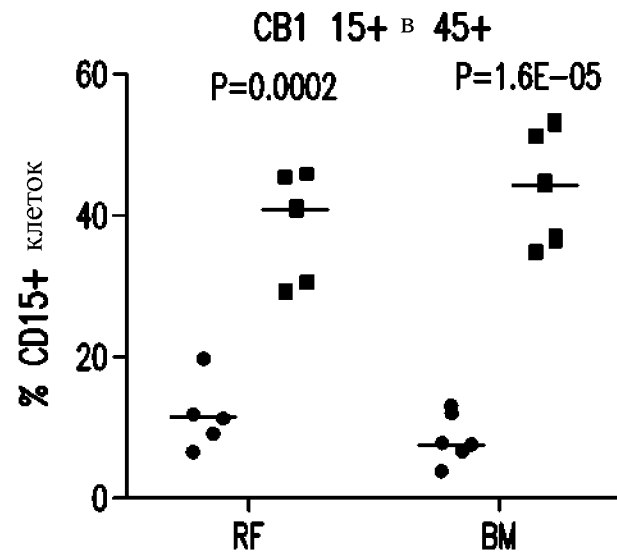


● среда
■ Соединение D

Фиг.9В (продолжение)

С. CD15+ и CD14+ в CD45+ трансплантате

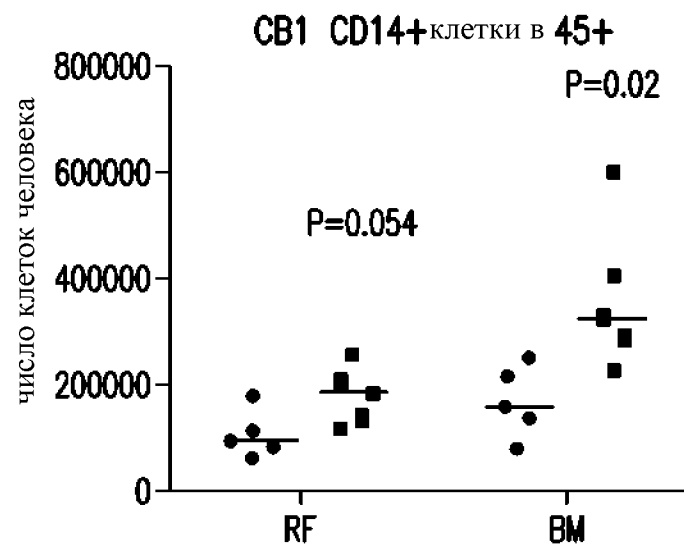
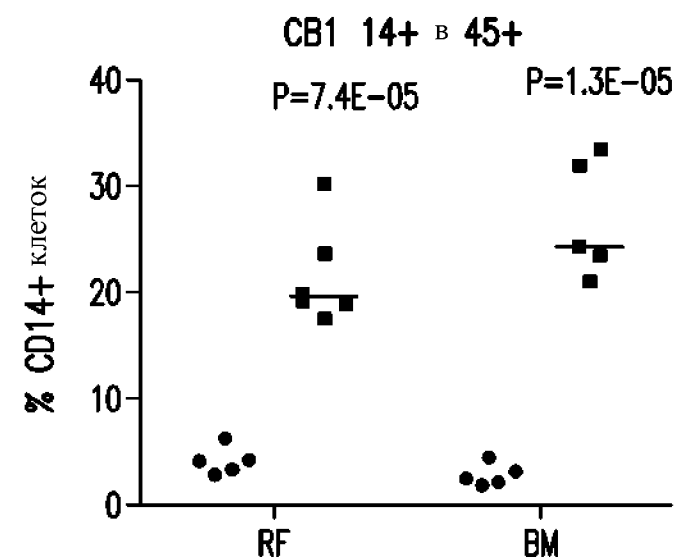
CD15+ в CD45+ трансплантате



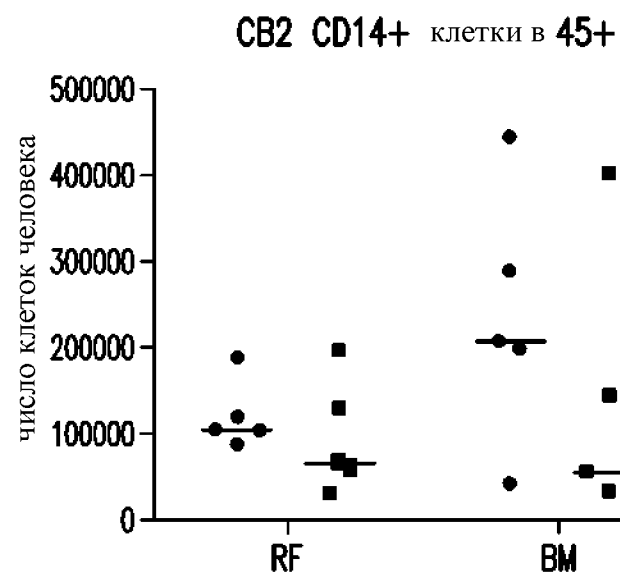
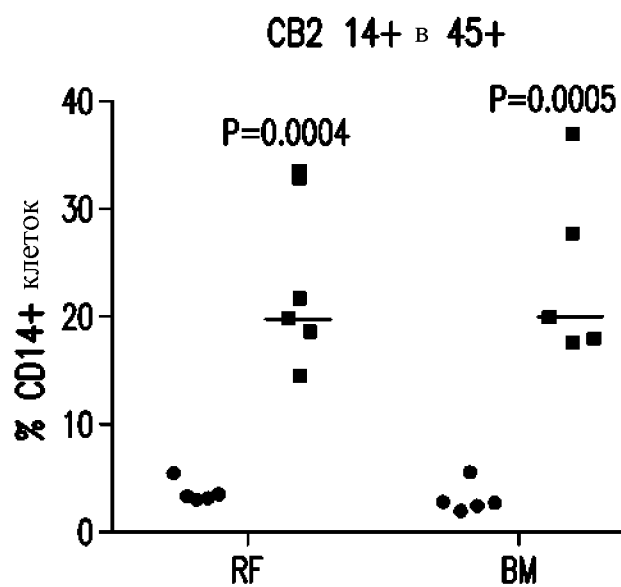
Фиг.9С

30/70

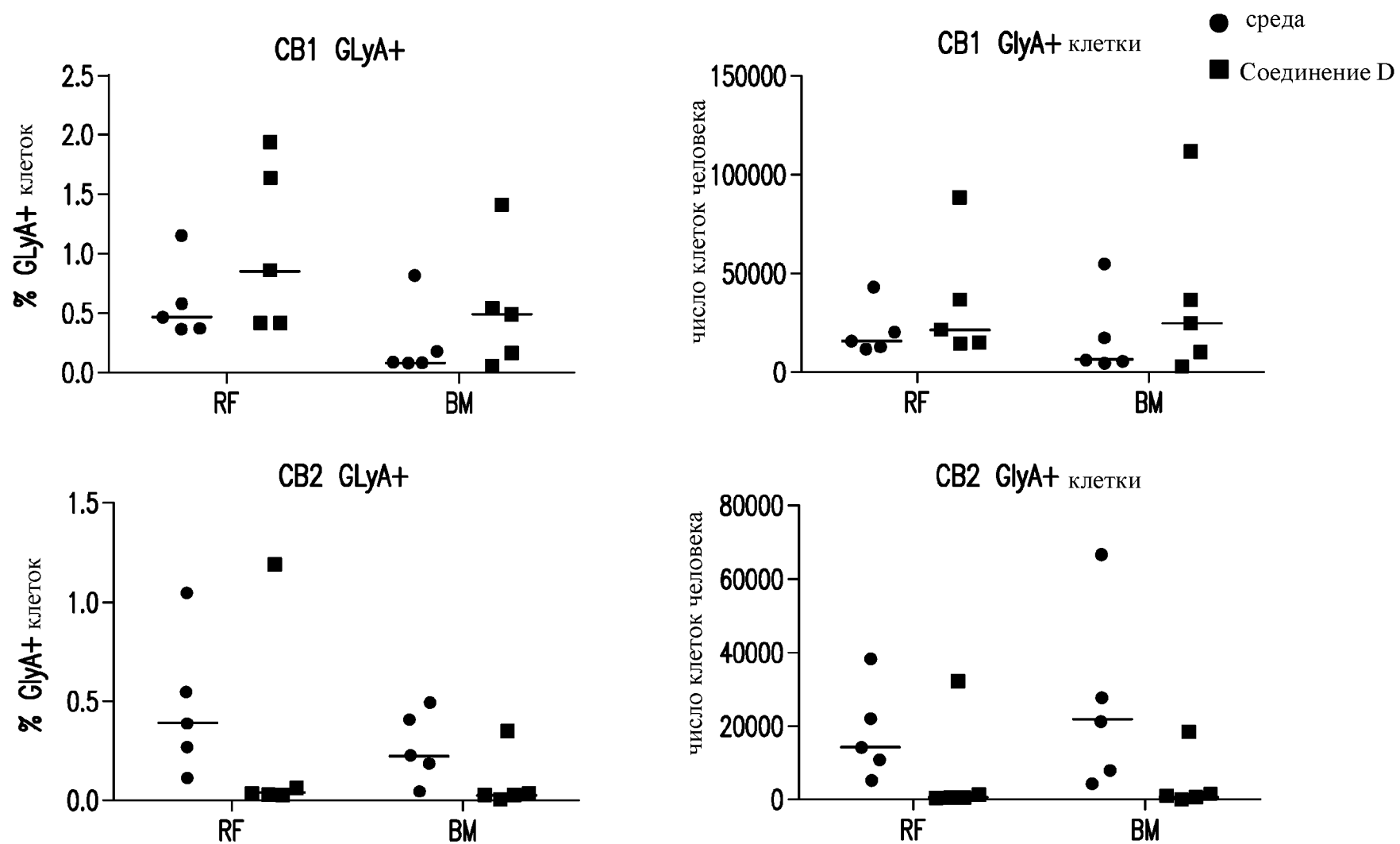
CD14+ в CD45+ трансплантате



● среда
■ Соединение D

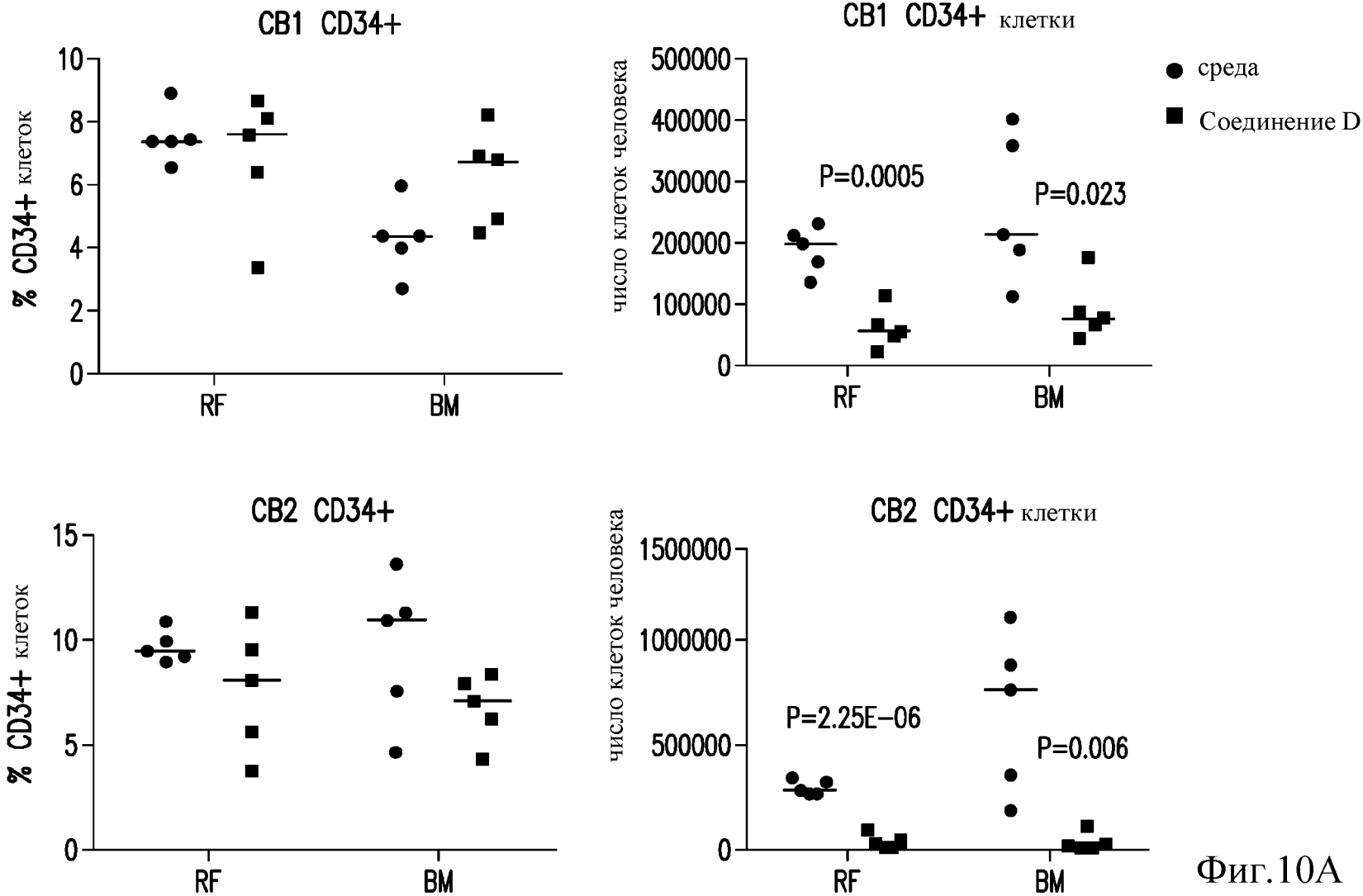


Фиг.9С (продолжение)



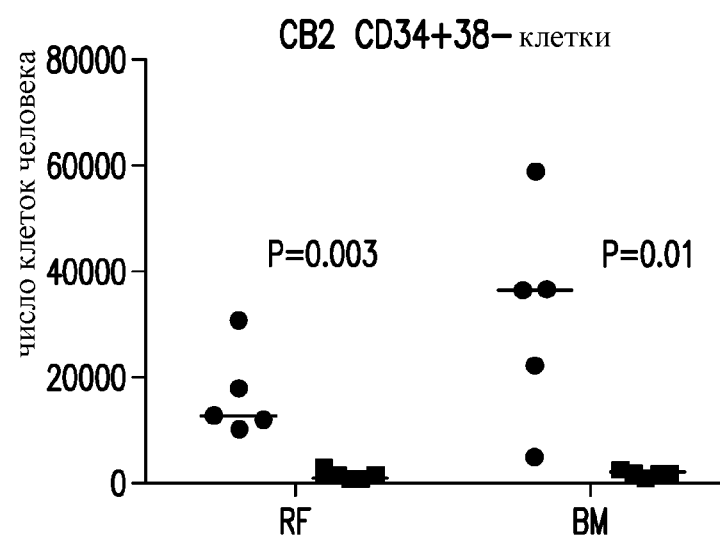
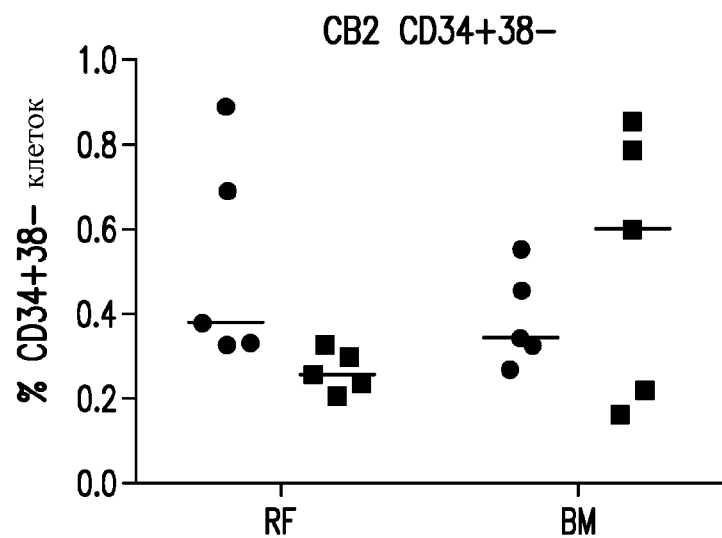
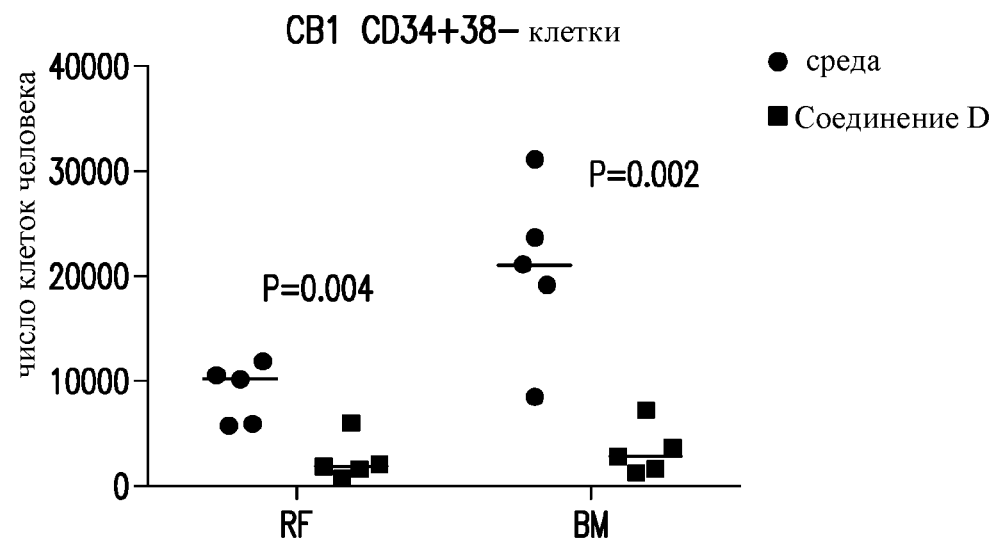
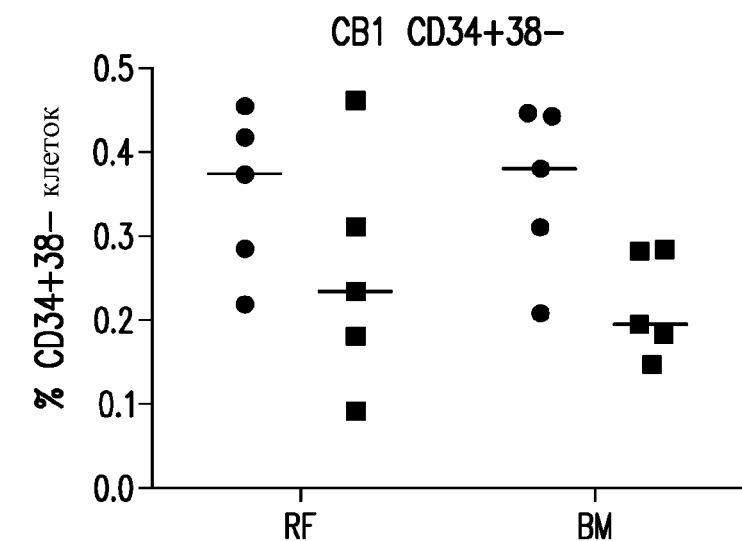
Фиг.9D

A. CD34+



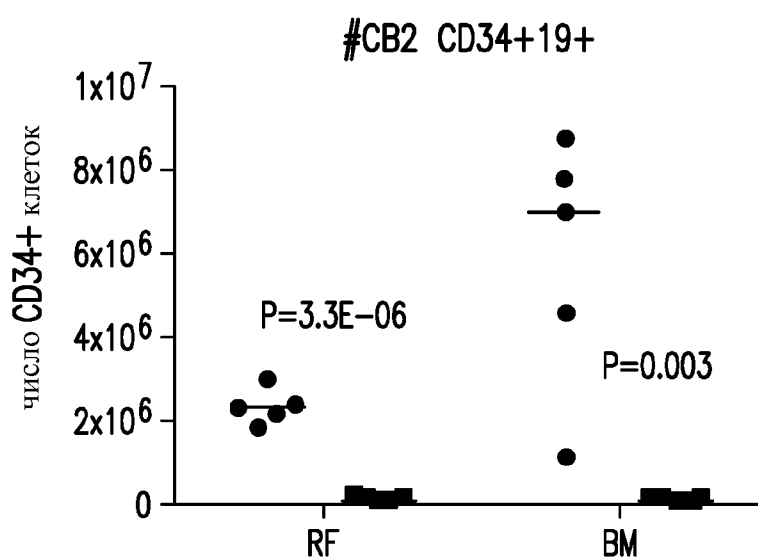
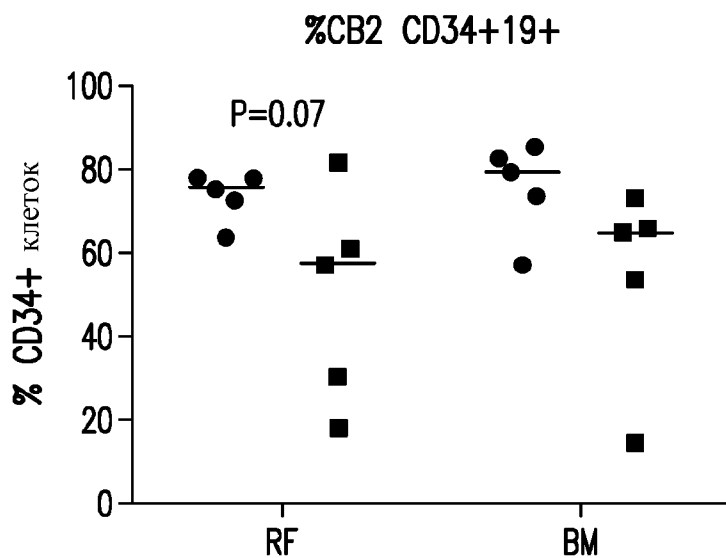
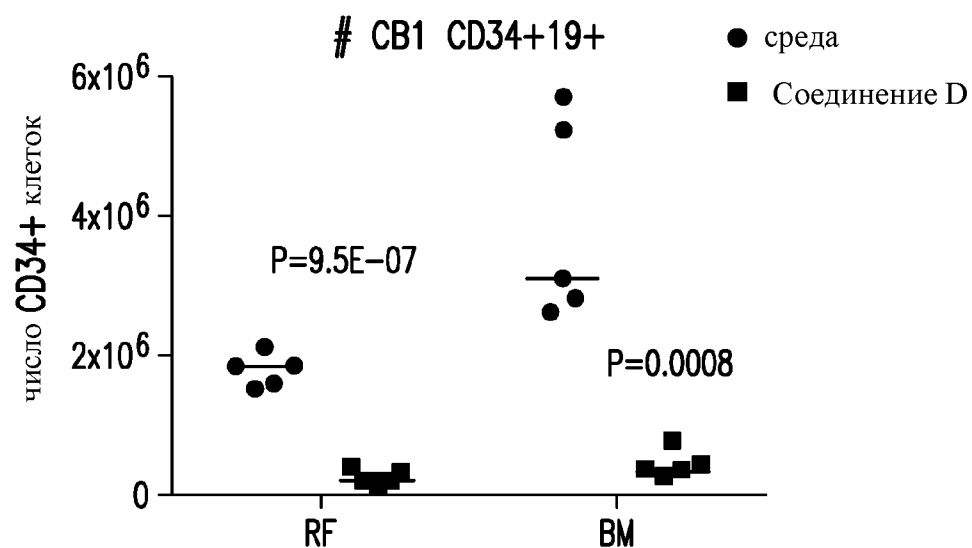
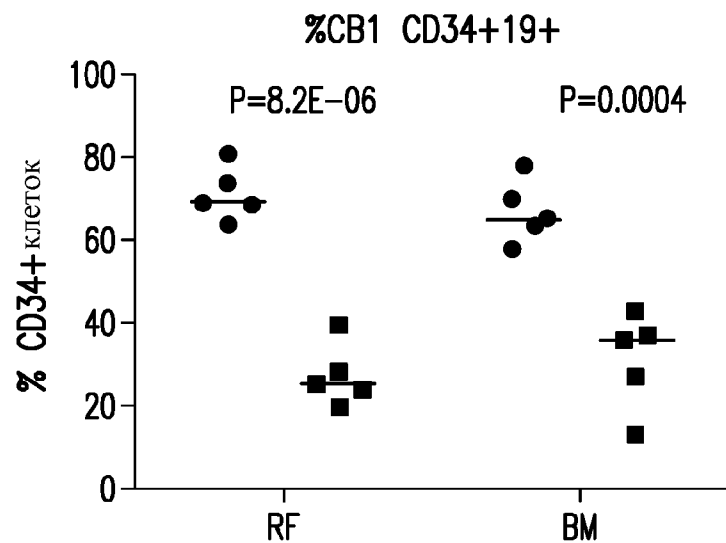
Фиг.10А

B. CD34+CD38-



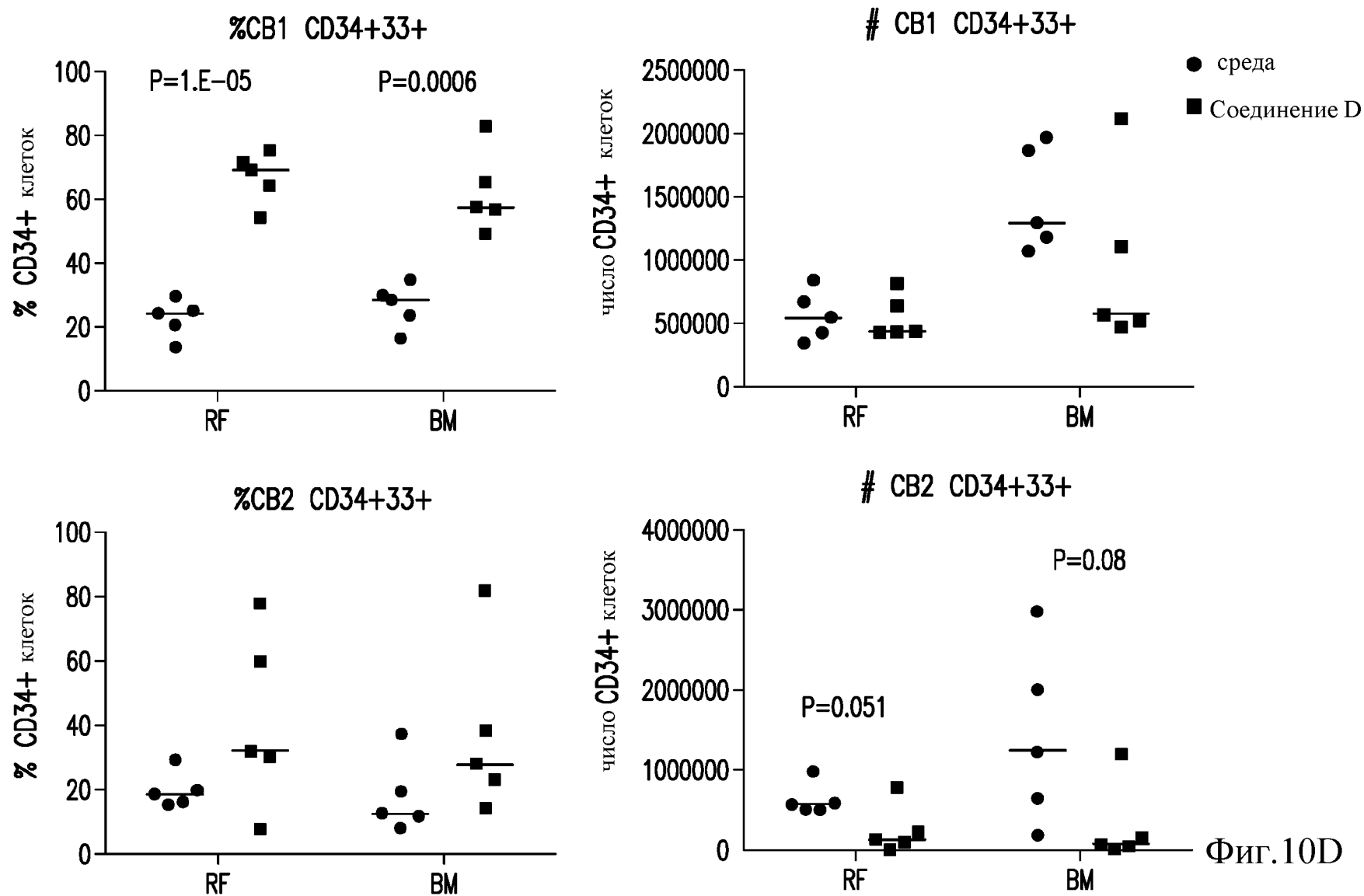
Фиг.10В

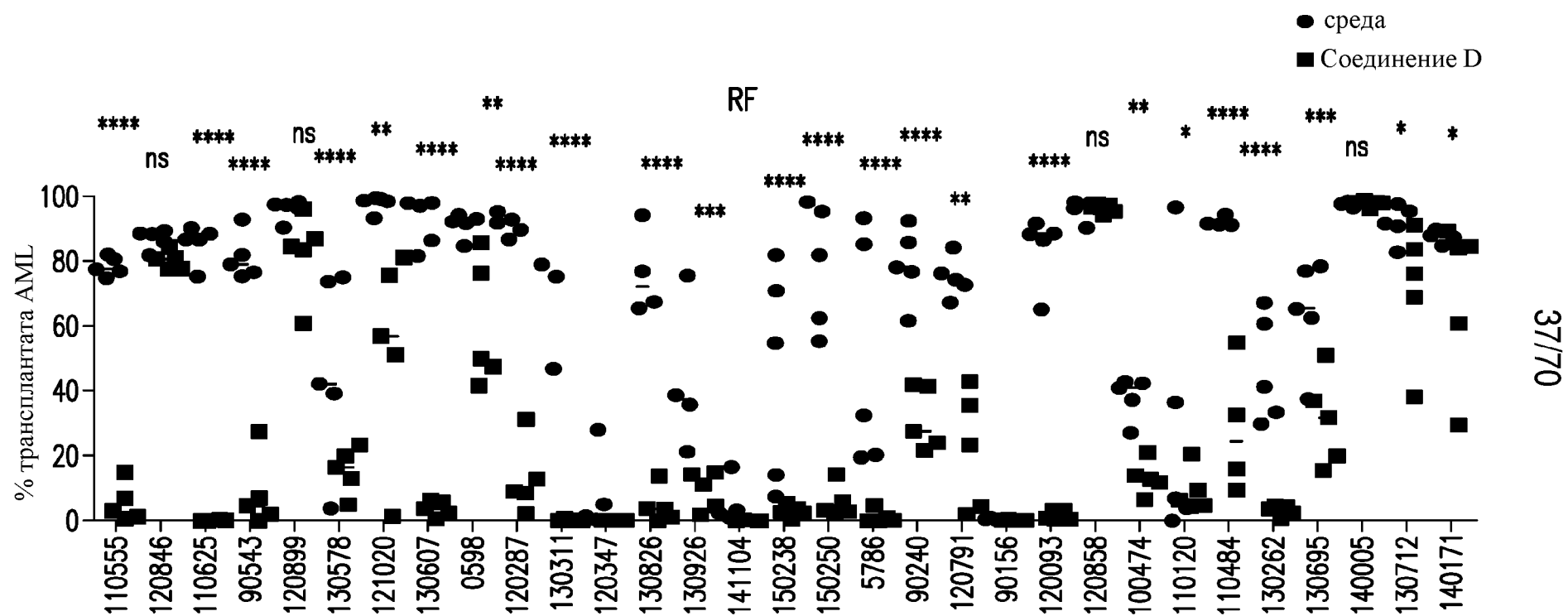
С. CD34+CD19+ лимфоидные



Фиг.10С

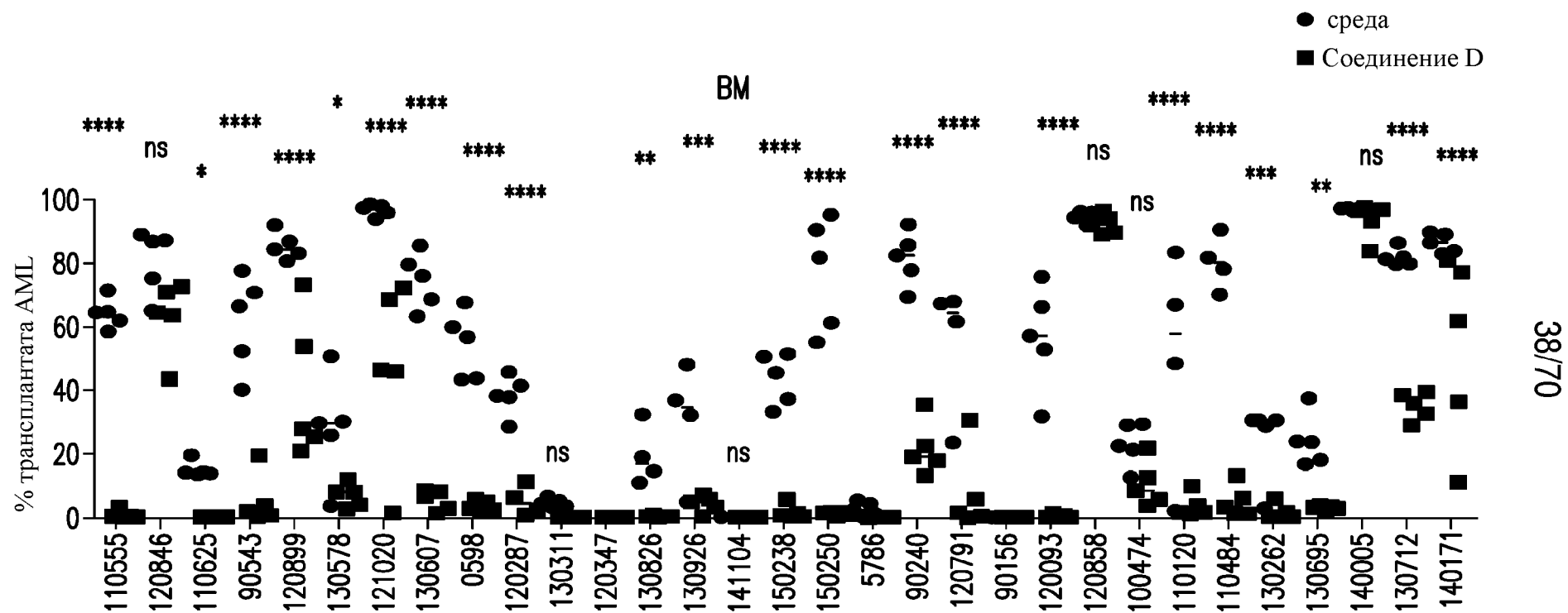
D. CD34+CD33+ миелоидные



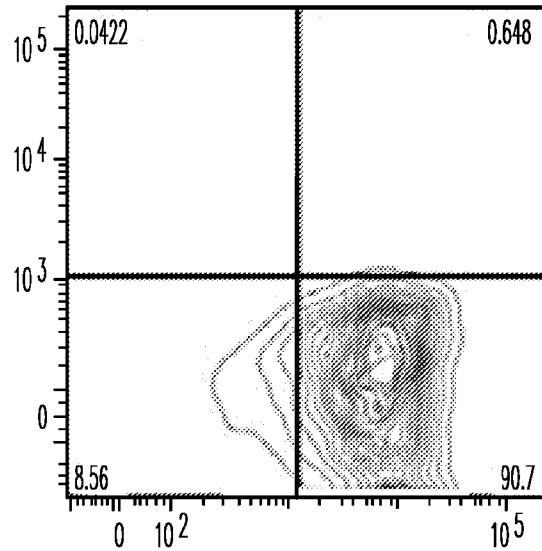
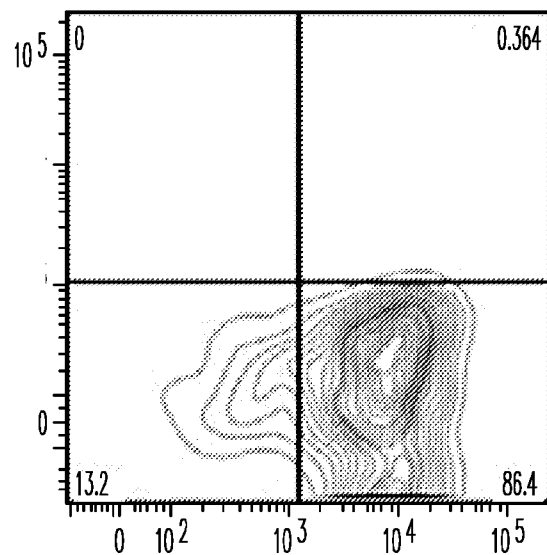
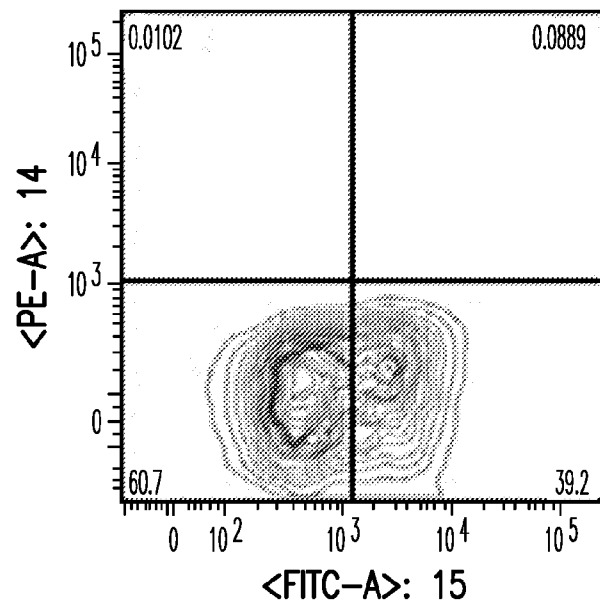
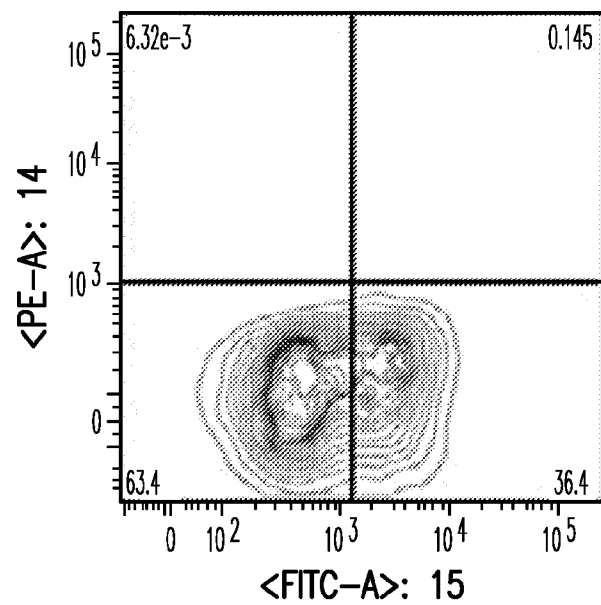


Фиг.11

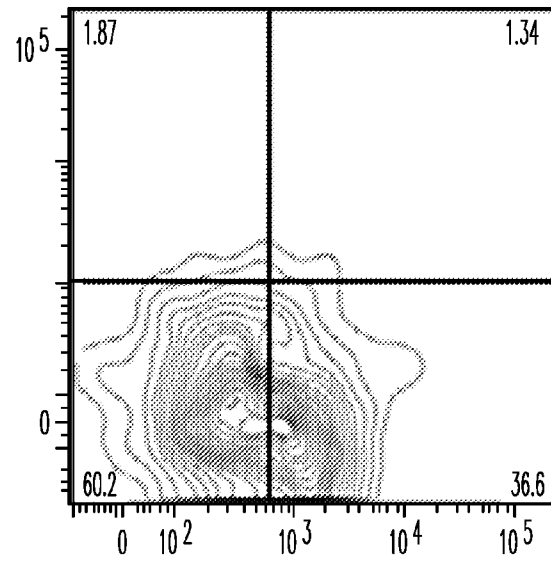
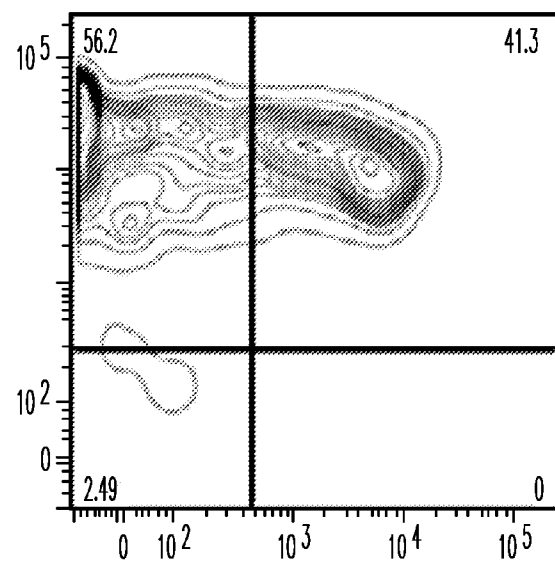
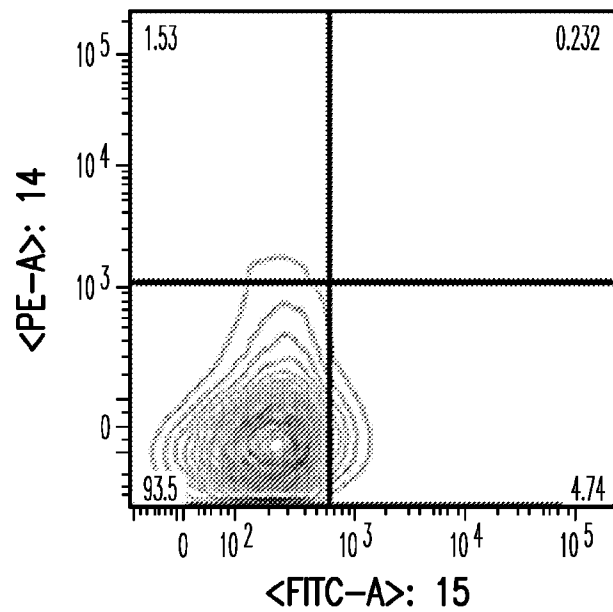
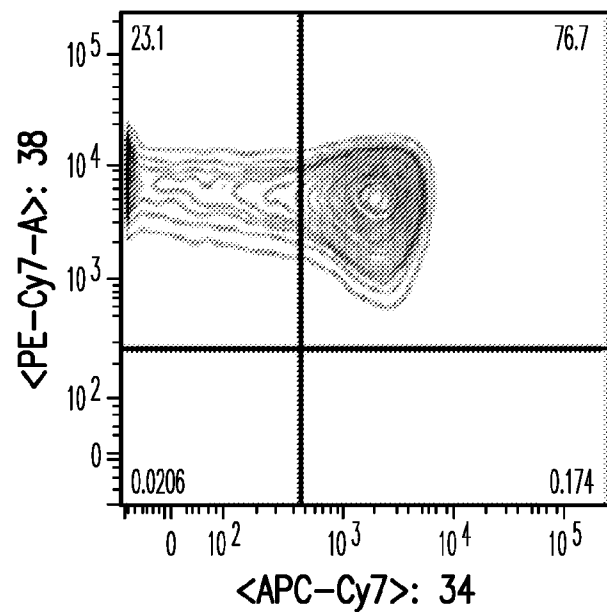
37/78



Фиг.11 (продолжение)



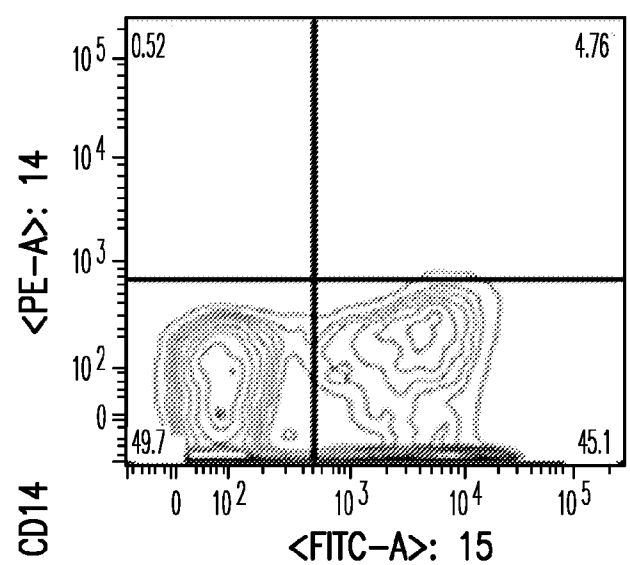
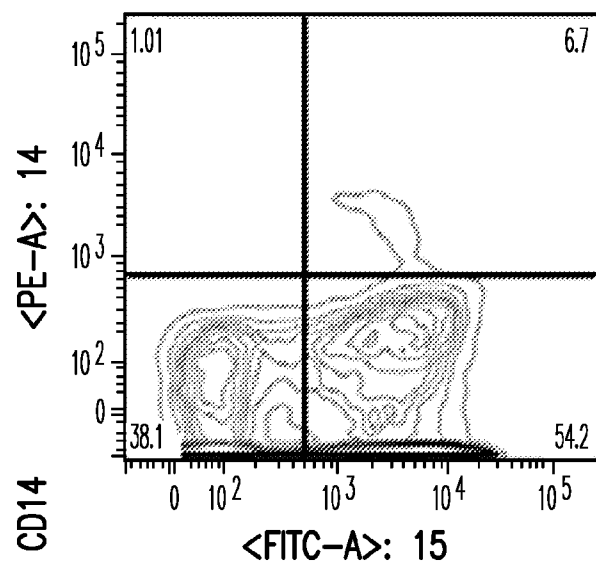
Фиг.12А



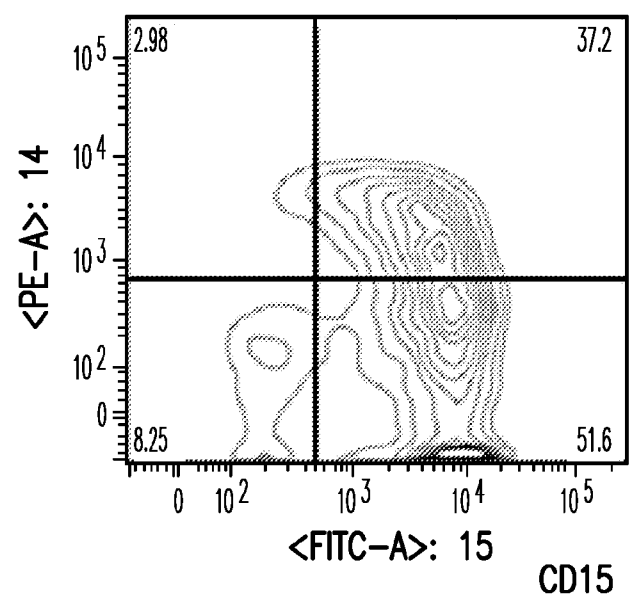
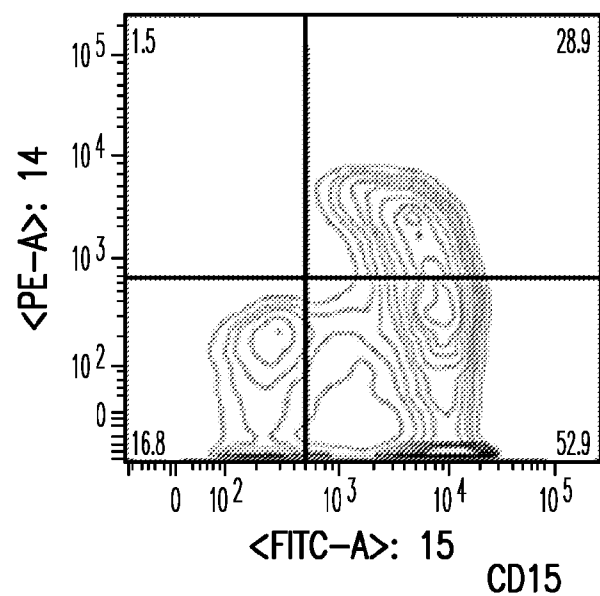
Соединение D

Фиг.12А (продолжение)

O



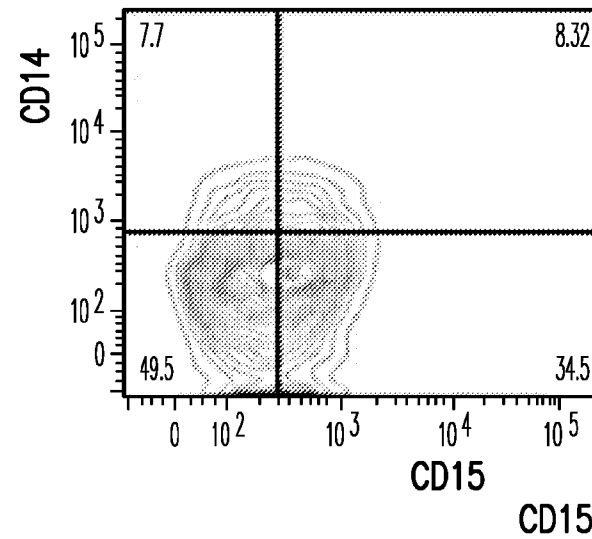
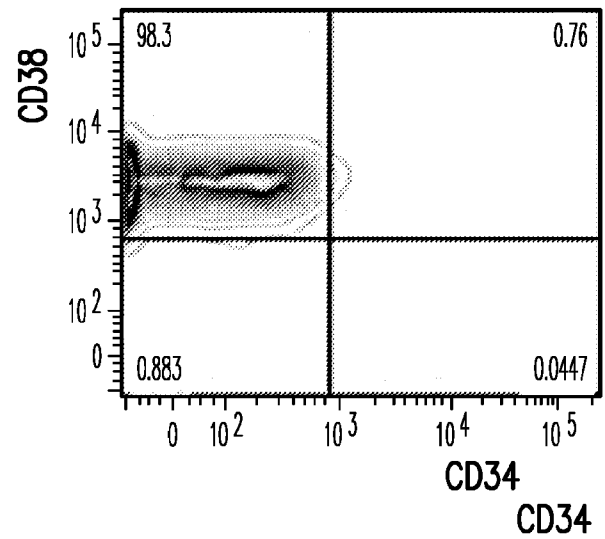
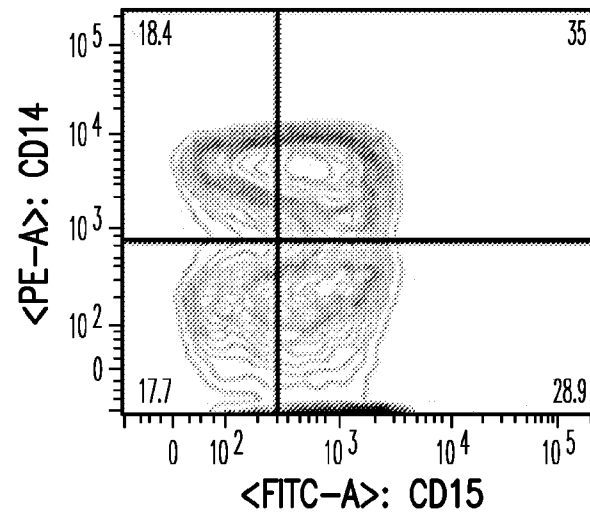
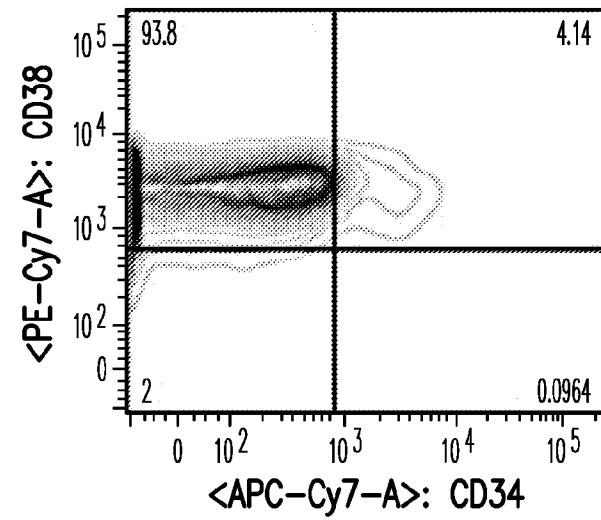
Средa



Соединение D

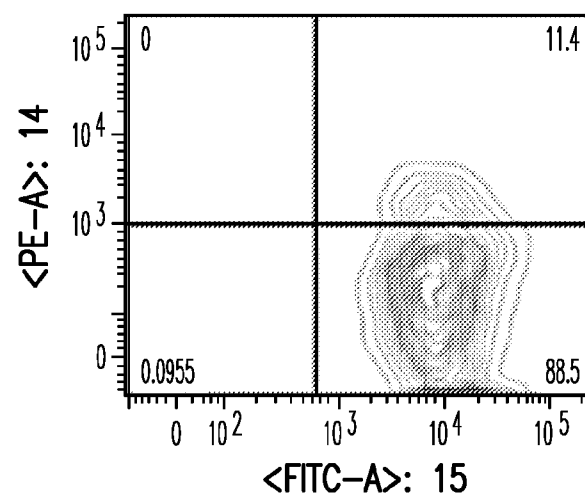
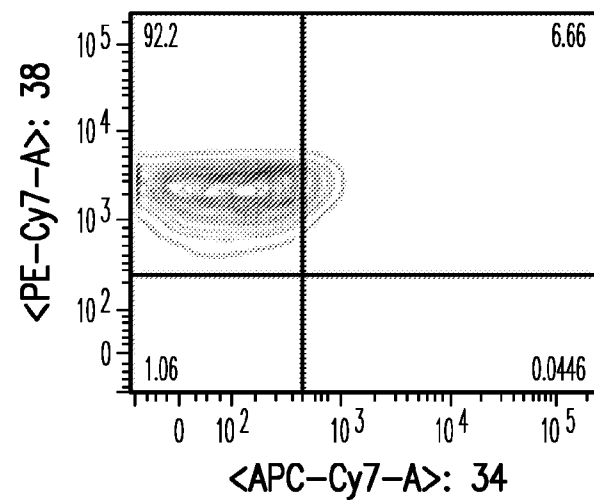
Фиг.12А (продолжение)

В: Соединение D индуцировало дифференцировку бластов AML

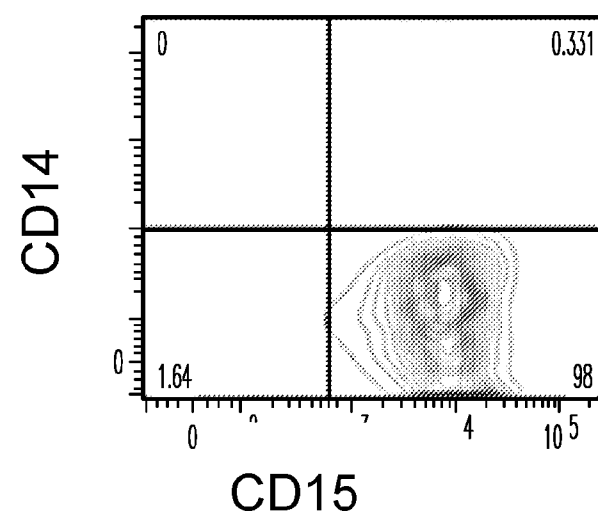
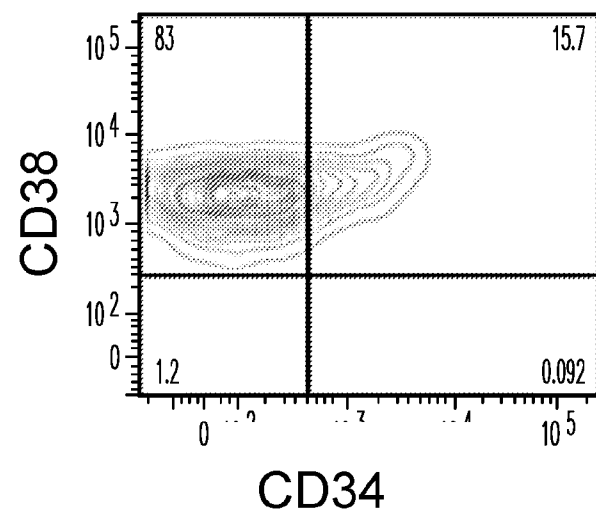


Фиг. 12В

100474 2ndry M5a LSC17lo

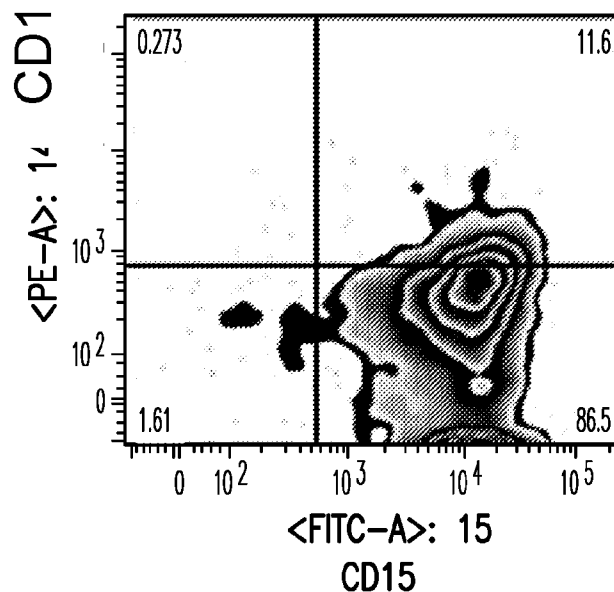
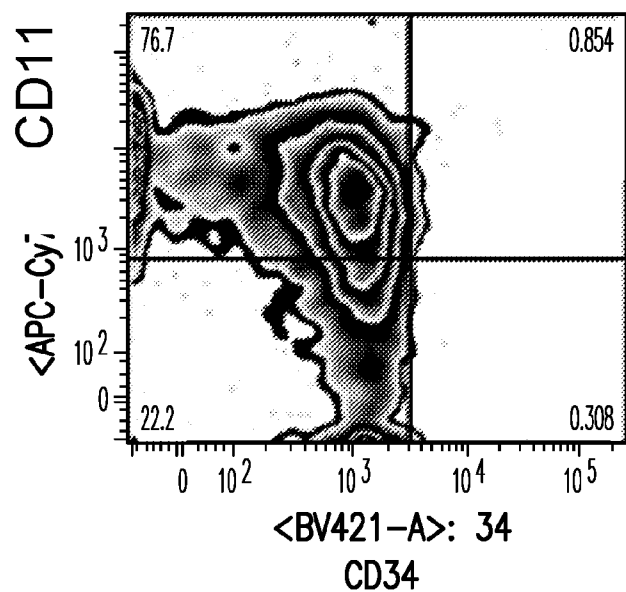
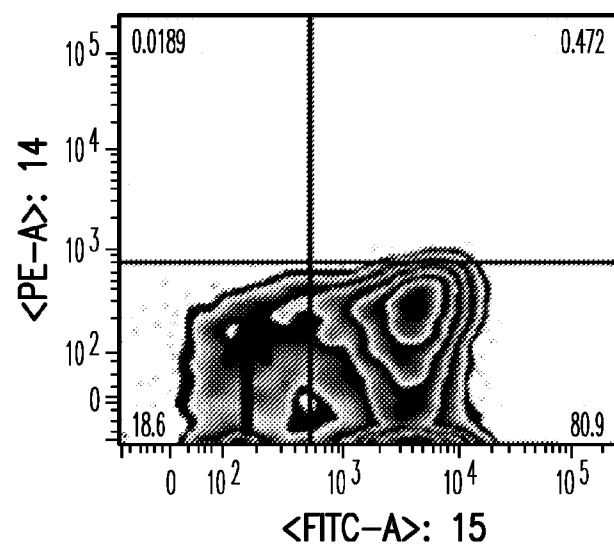
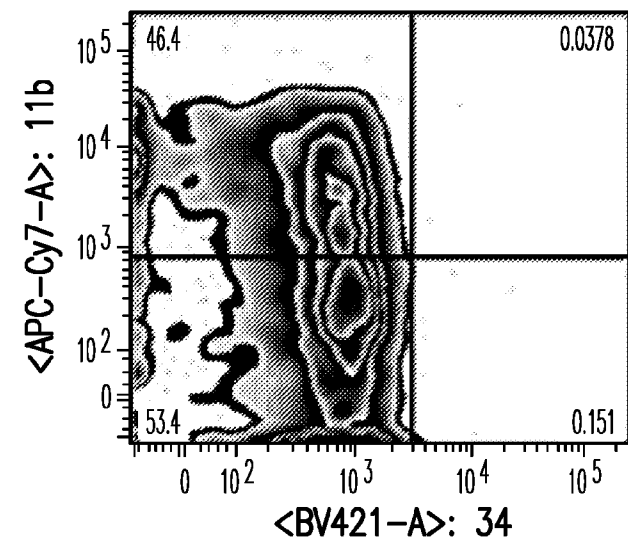


Среда

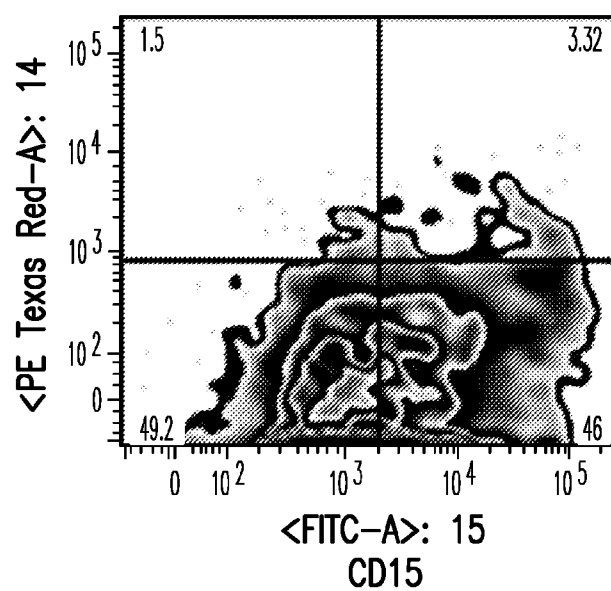
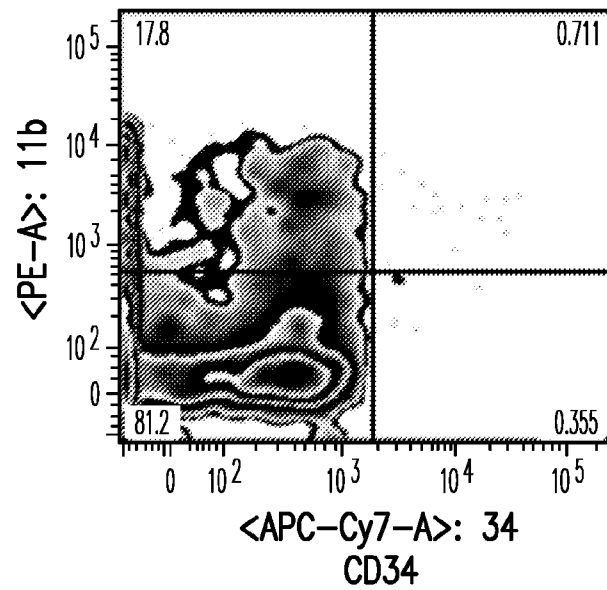
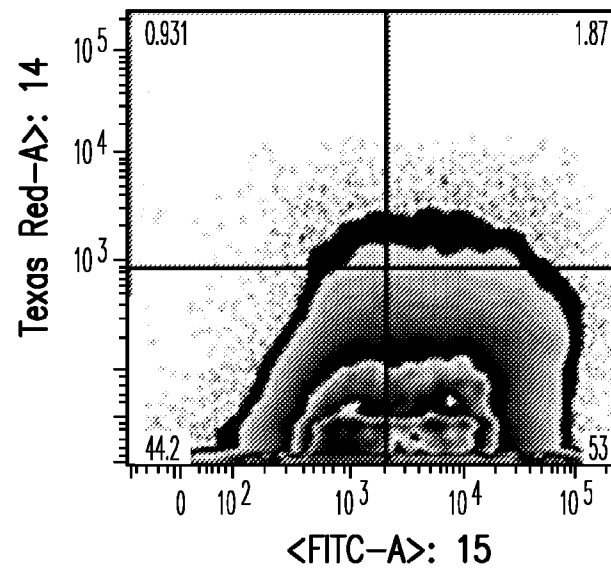
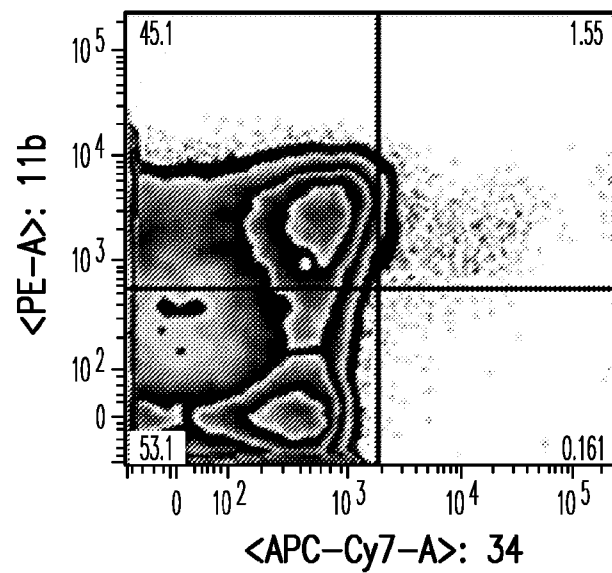


Соединение D

Фиг.12В (продолжение)



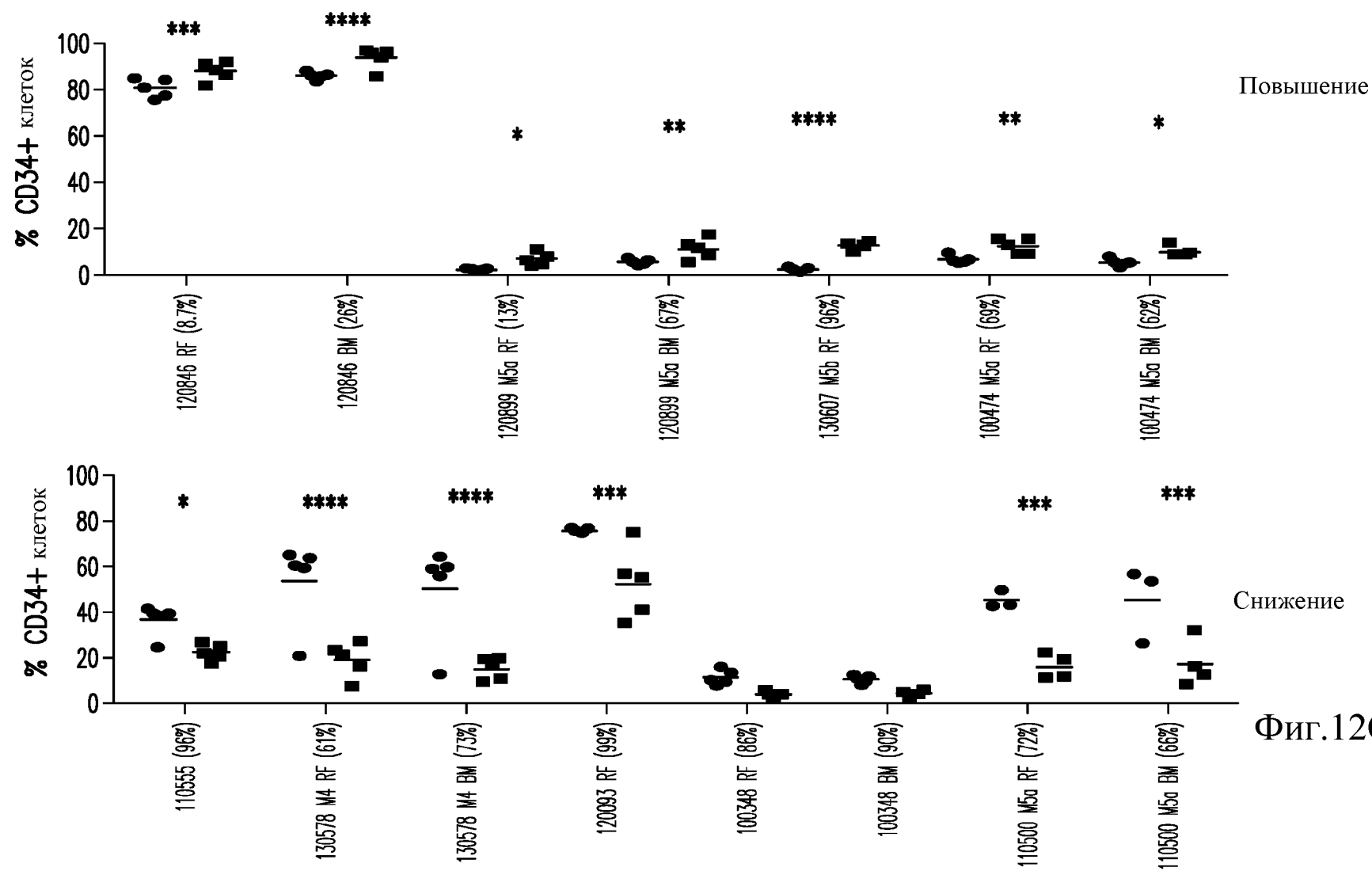
Фиг.12В (продолжение)



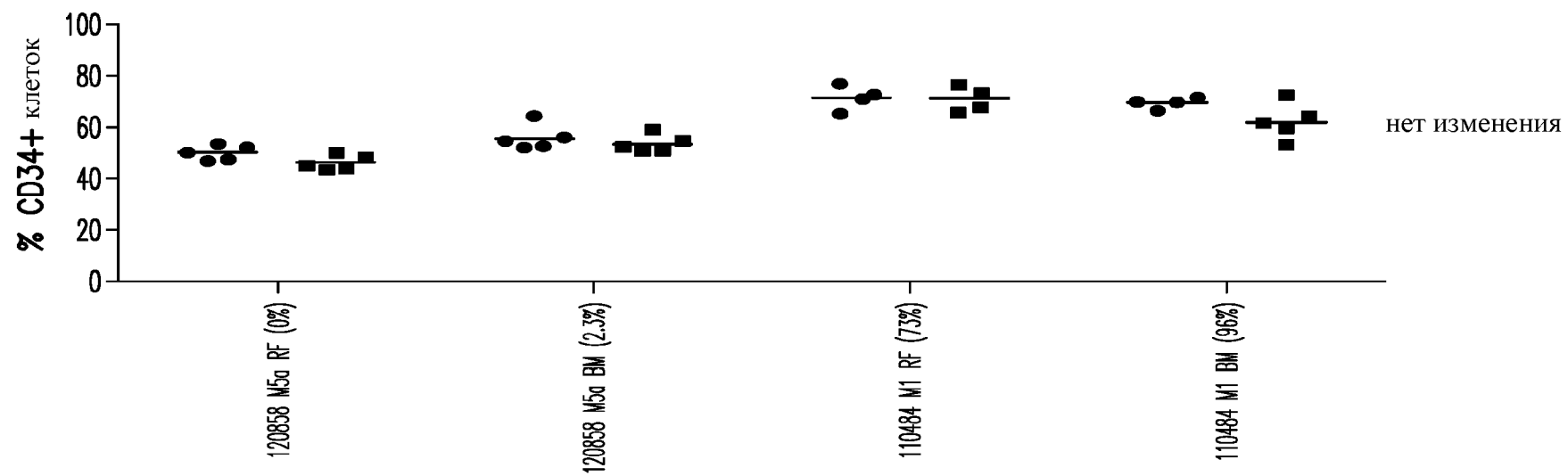
Соединение D

Фиг.12В (продолжение)

С: Процент **CD34+** клеток в трансплантате AML после обработки Соединением D

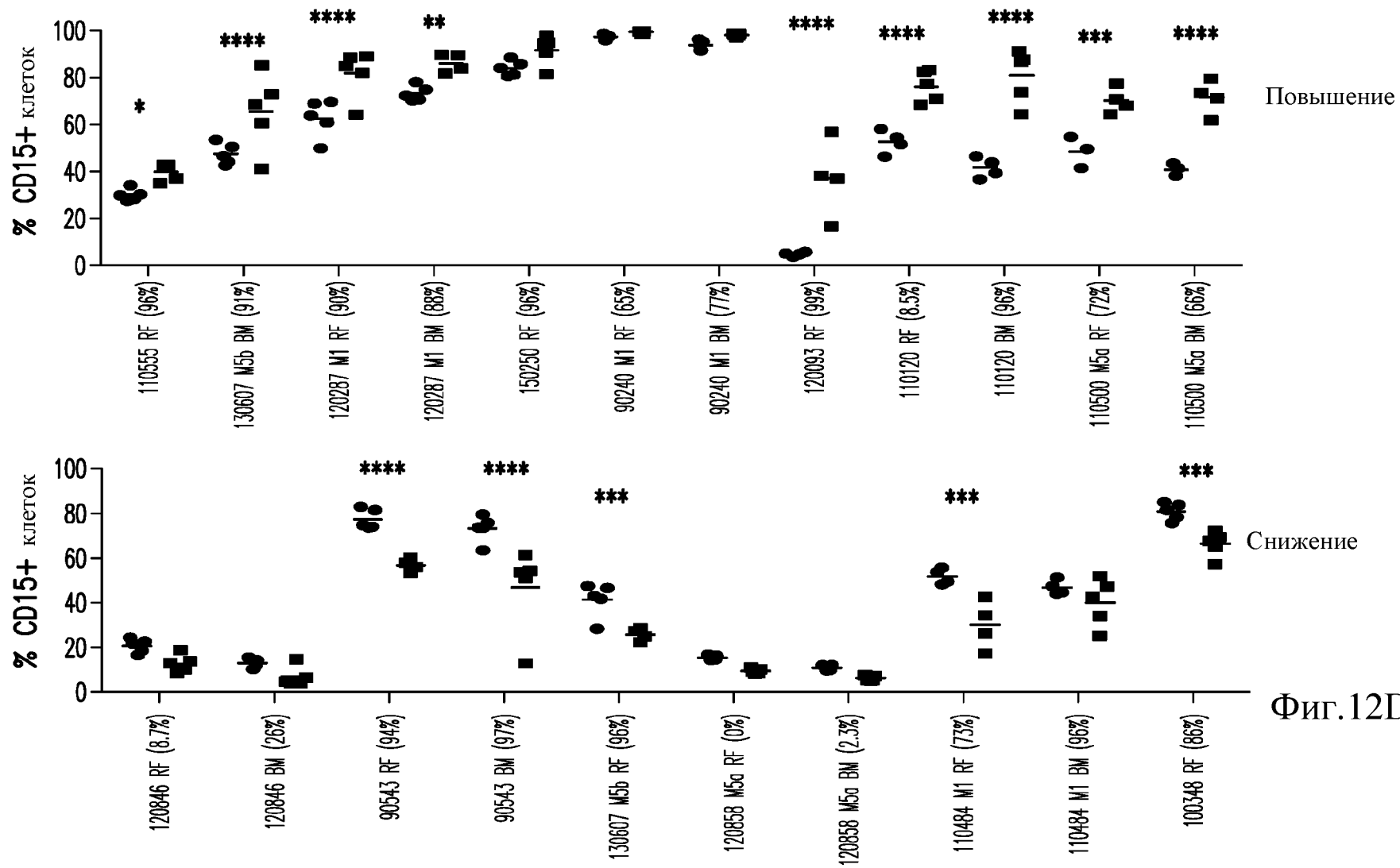


Фиг.12С

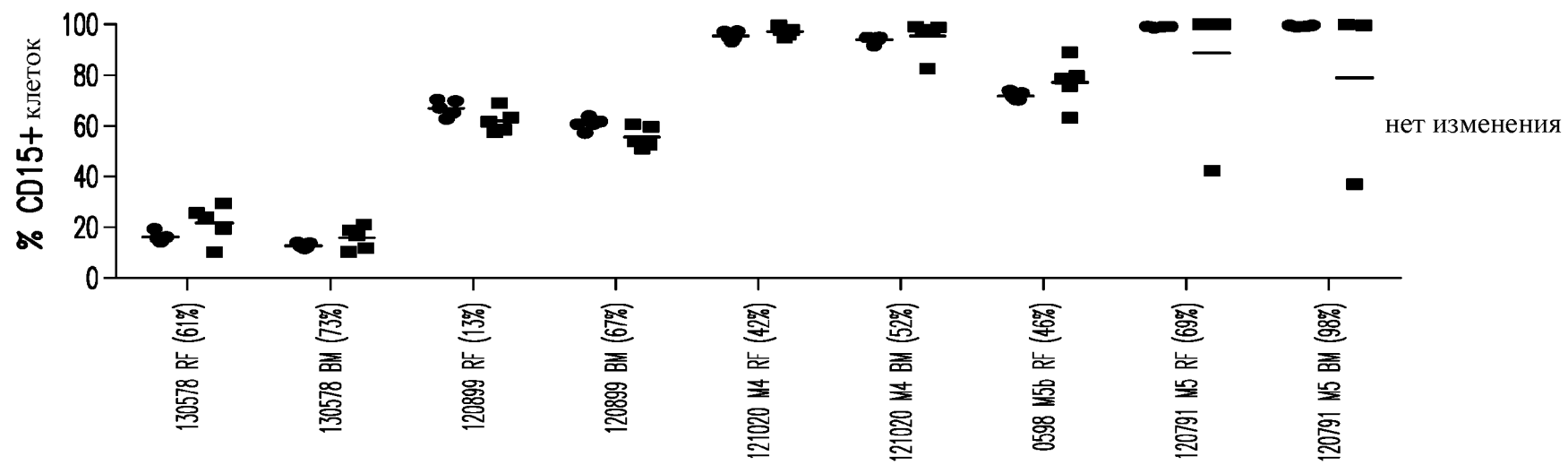


Фиг.12С (продолжение)

D: Процент CD15+ клеток в трансплантате AML после обработки Соединением D

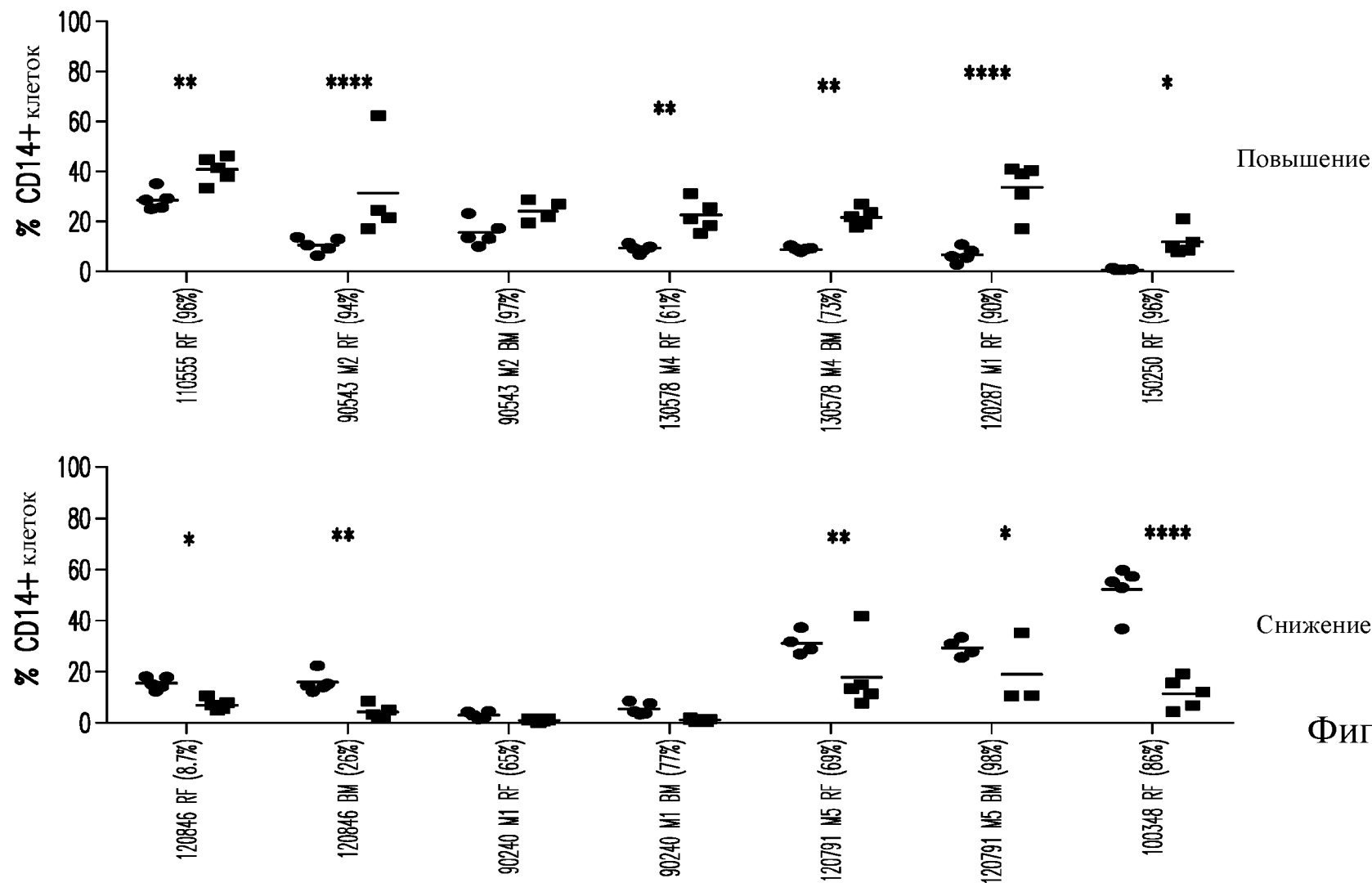


Фиг.12D

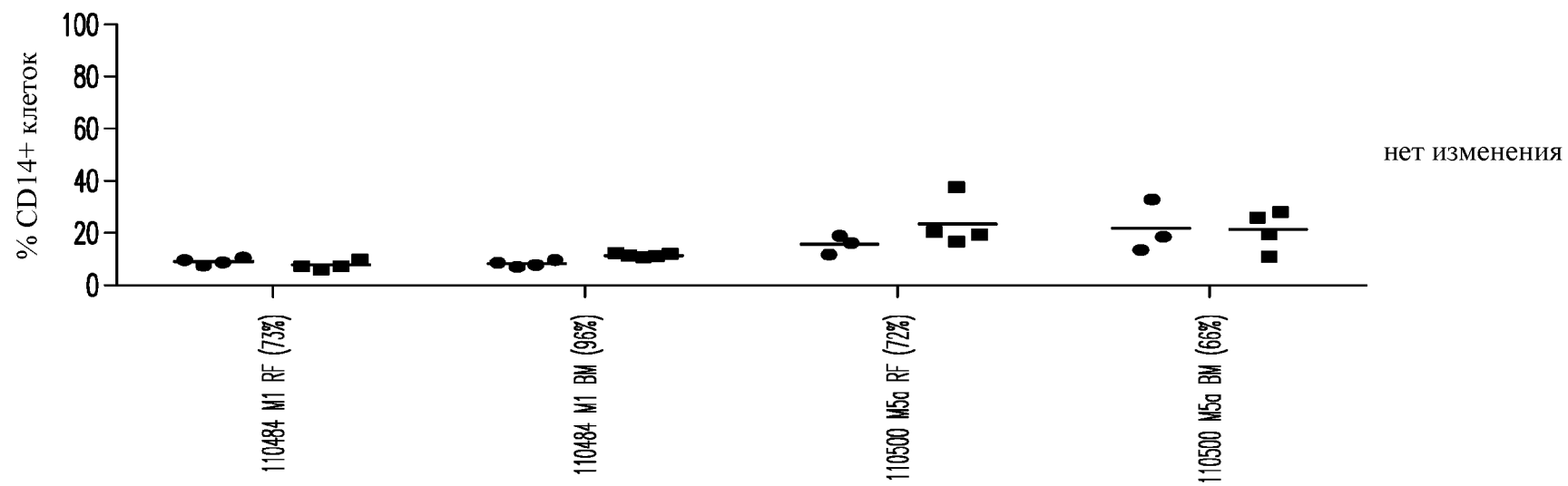


Фиг.12D (продолжение)

Е: Процент **CD14+** клеток в трансплантате AML после обработки Соединением D

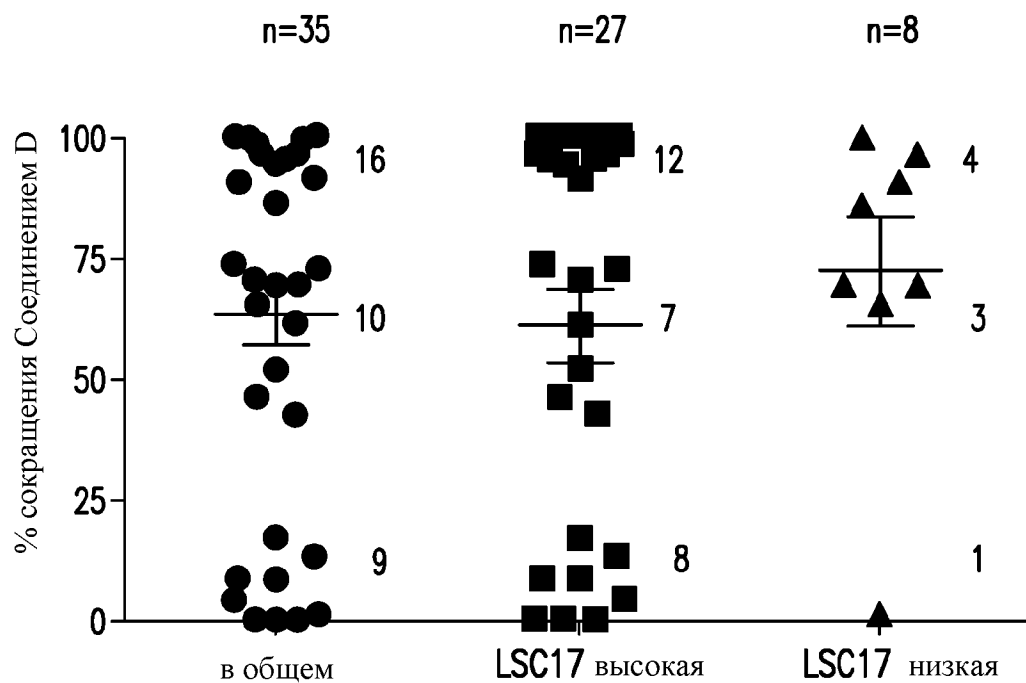


Фиг.12Е

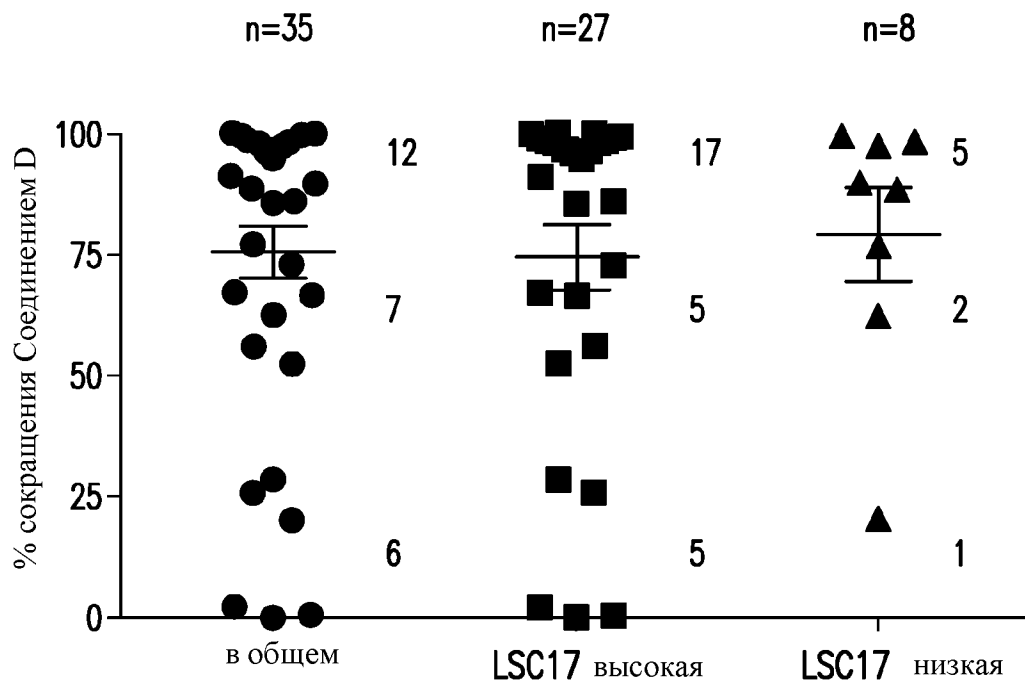


Фиг.12Е (продолжение)

In vivo эффективность высокой по сравнению с низкой оценки LSC17 в RF

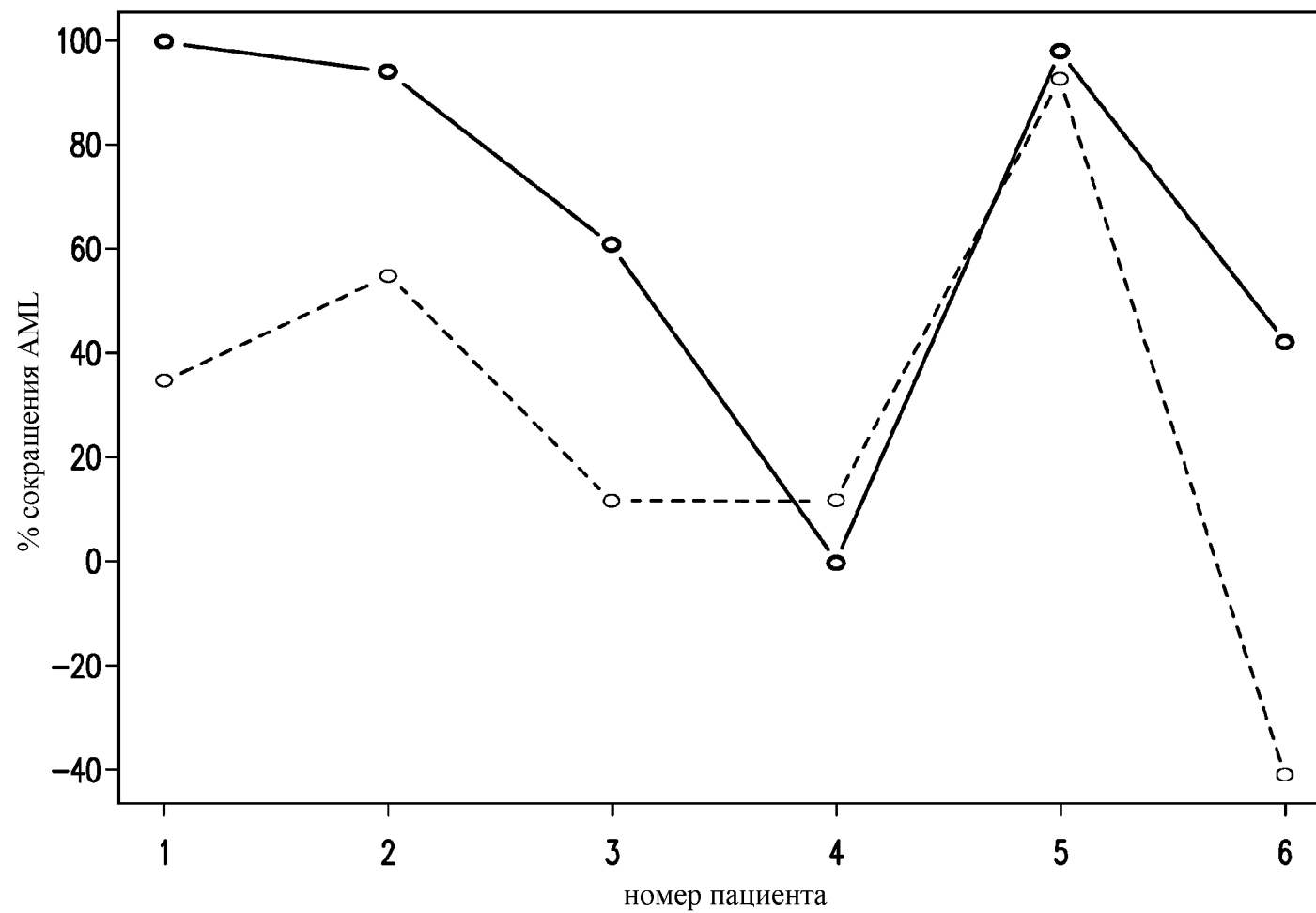


In vivo эффективность высокой по сравнению с низкой оценки LSC17 в BM



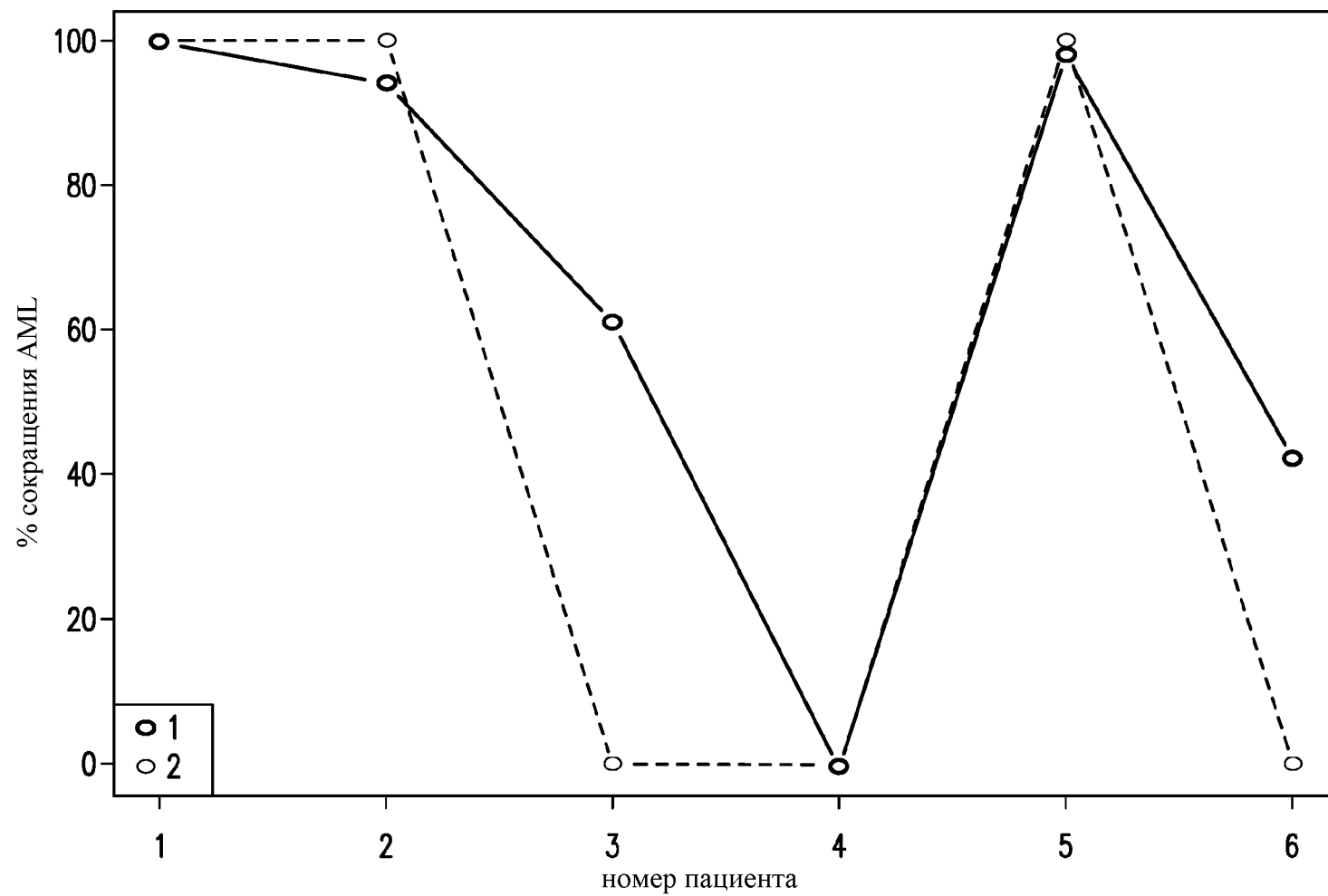
Фиг.13

А. 4 генная оценка, обнаруженная среди 89 генов



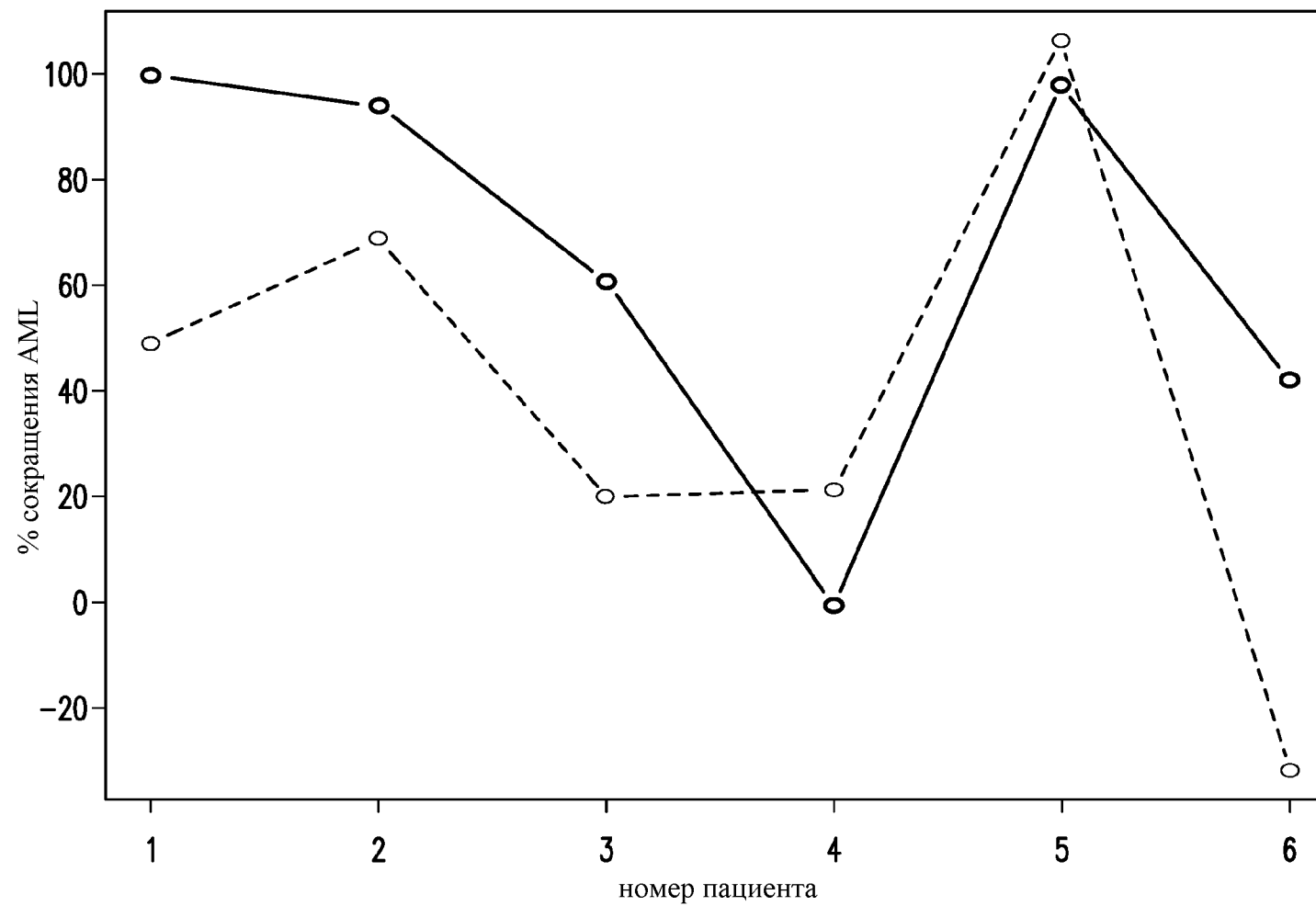
Фиг.14А

В. 4 генная оценка прогнозирует % сокращения



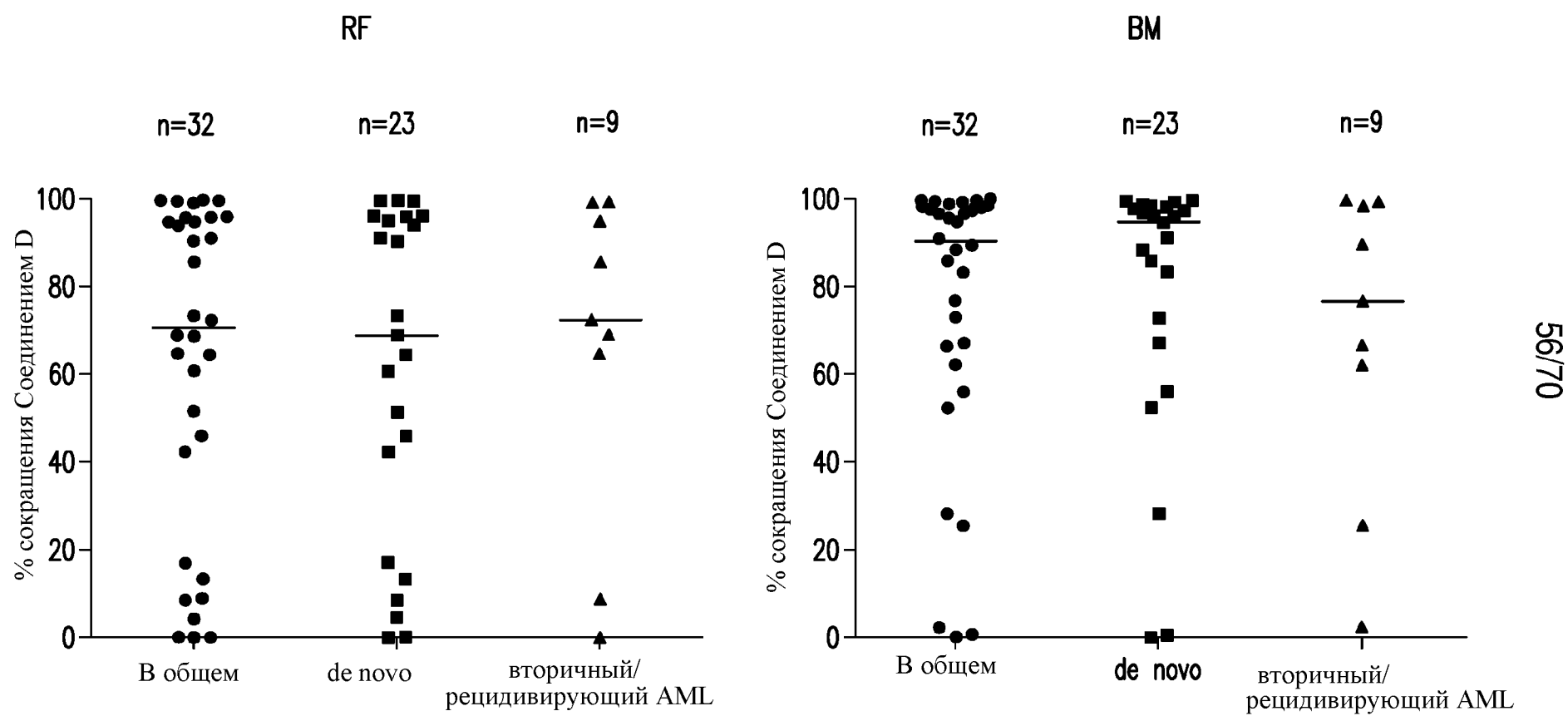
Фиг.14В

С. 3 генная оценка, обнаруженная среди LSC генов



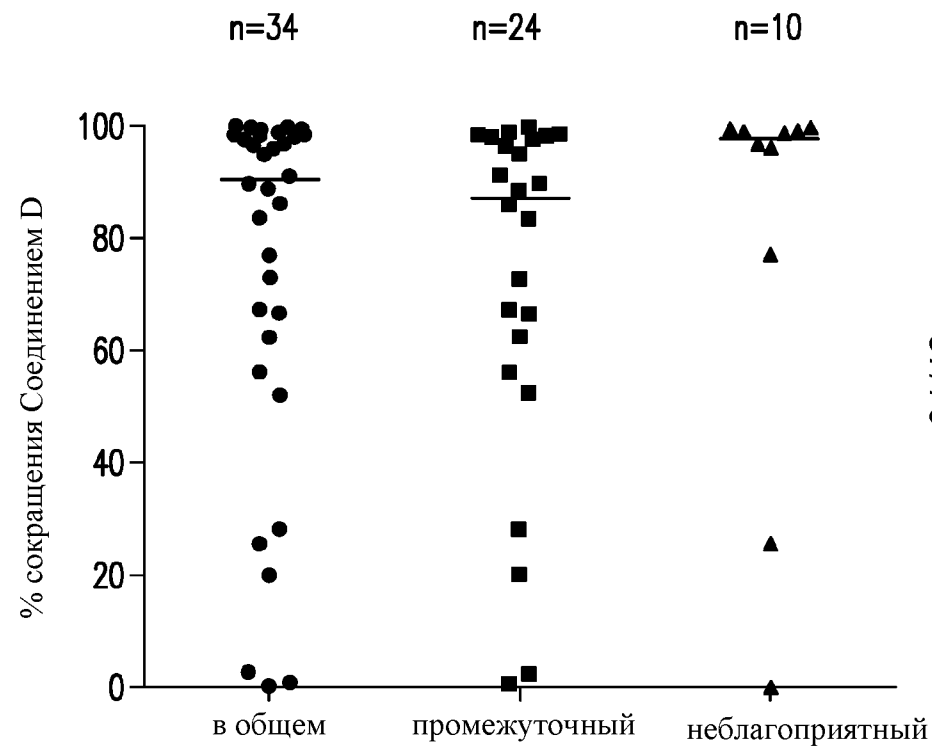
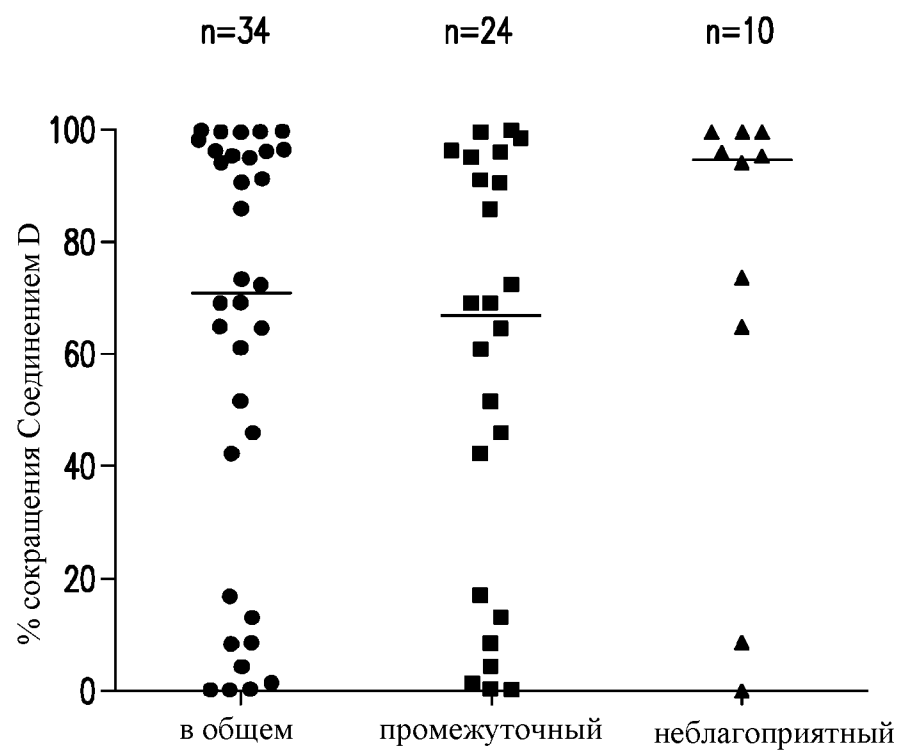
Фиг.14С

A: AML de novo по сравнению со вторичным



Фиг.15А

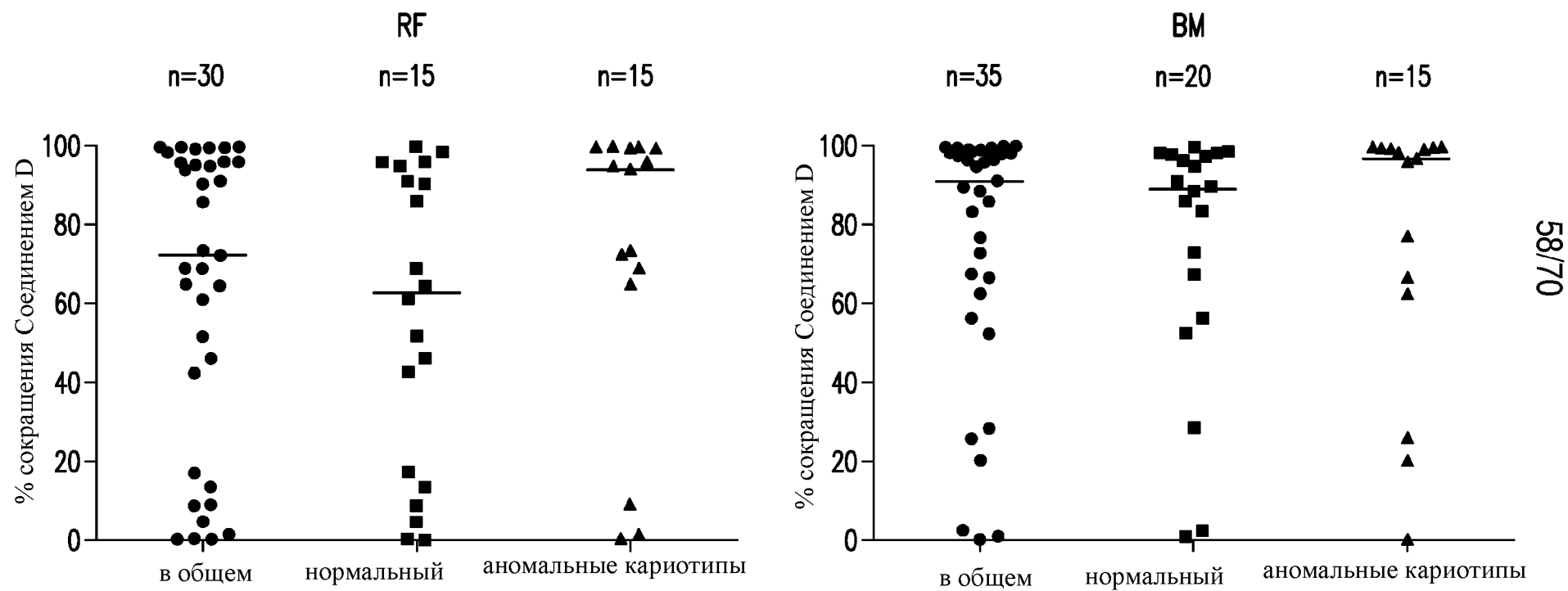
В: Прогноз неблагоприятный по сравнению с промежуточным



57/70

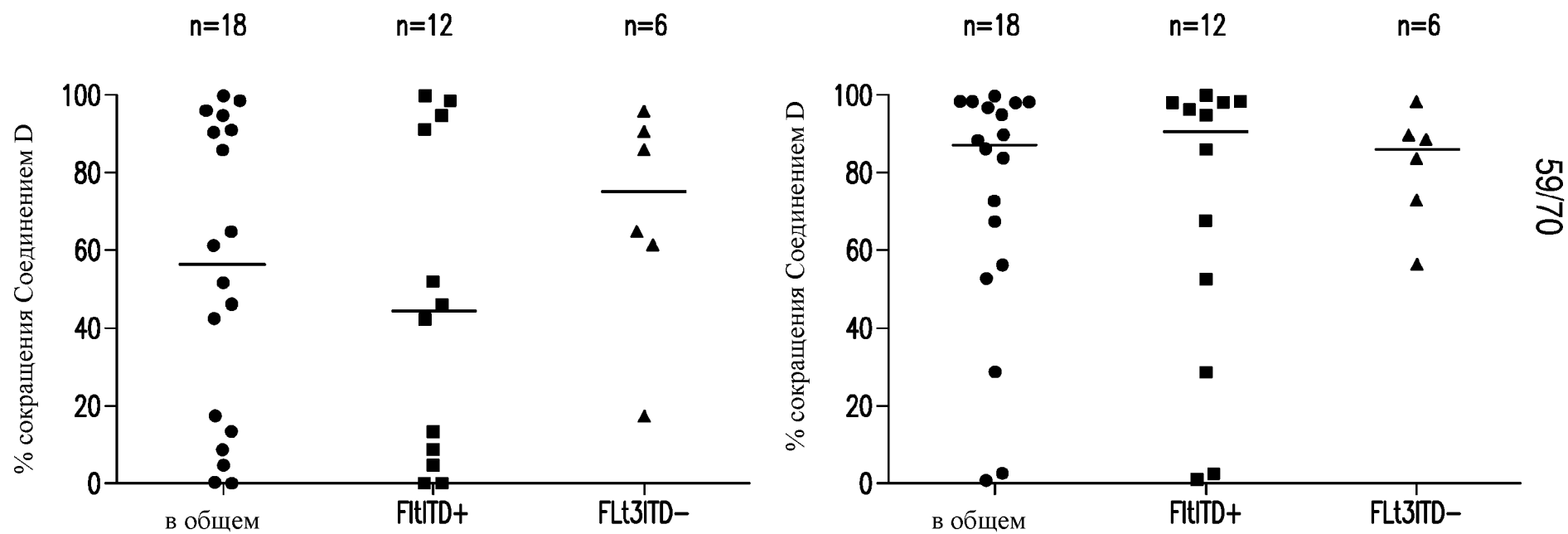
Фиг.15В

C: Цитогенетически нормальный AML по сравнению с аномальным

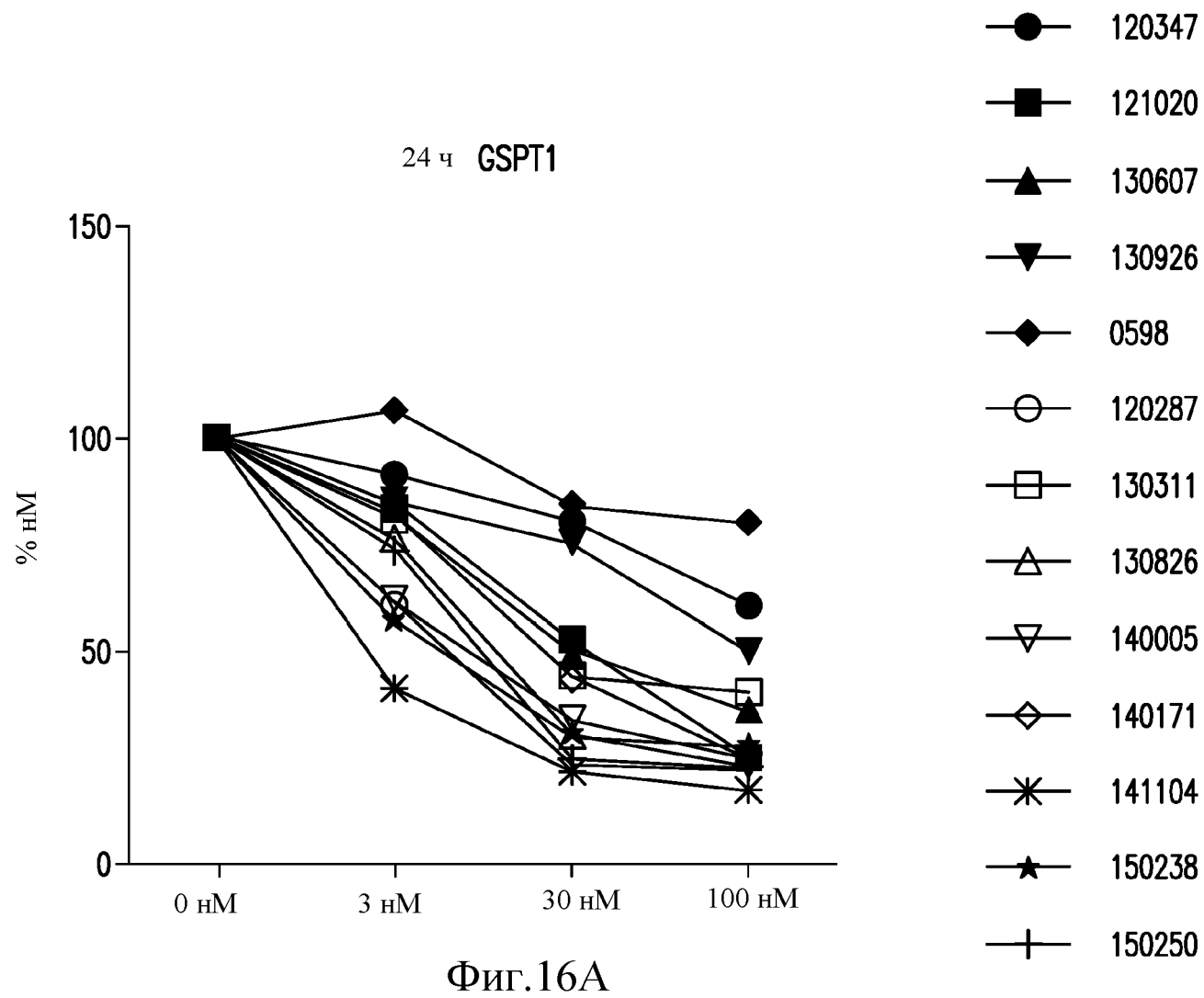


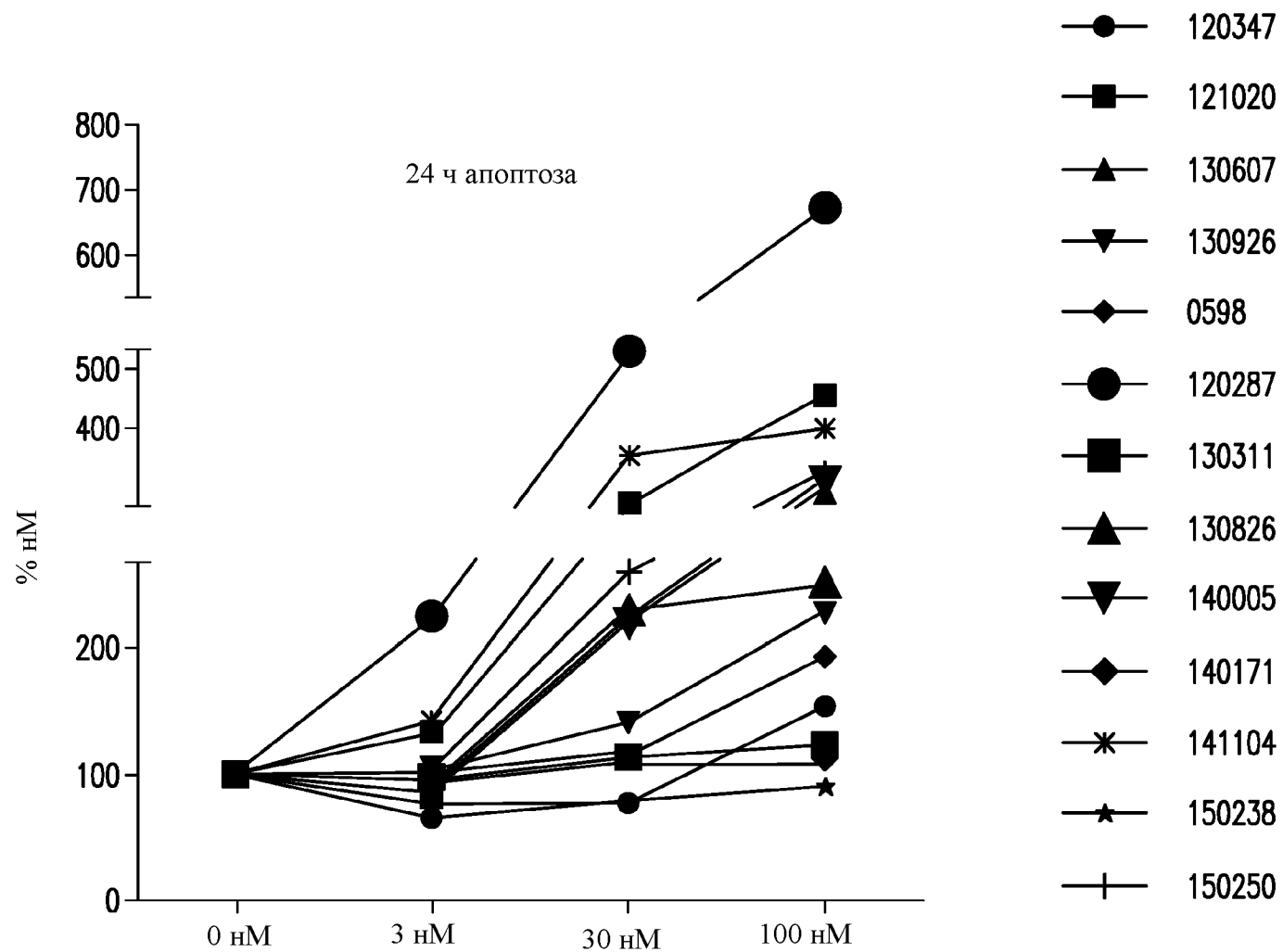
Фиг.15С

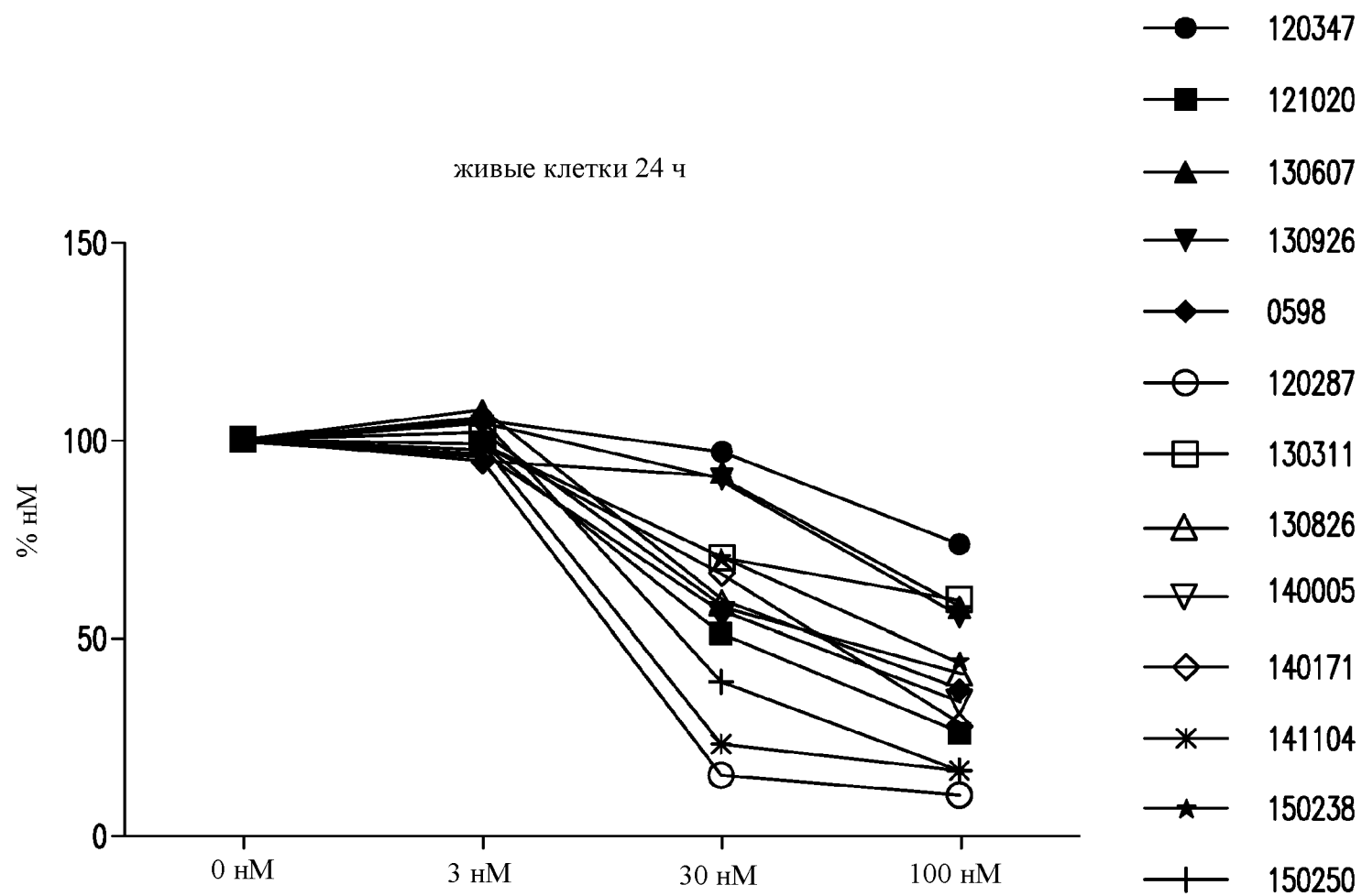
D: FLT3-ITD положительный по сравнению с отрицательным в в CN AML



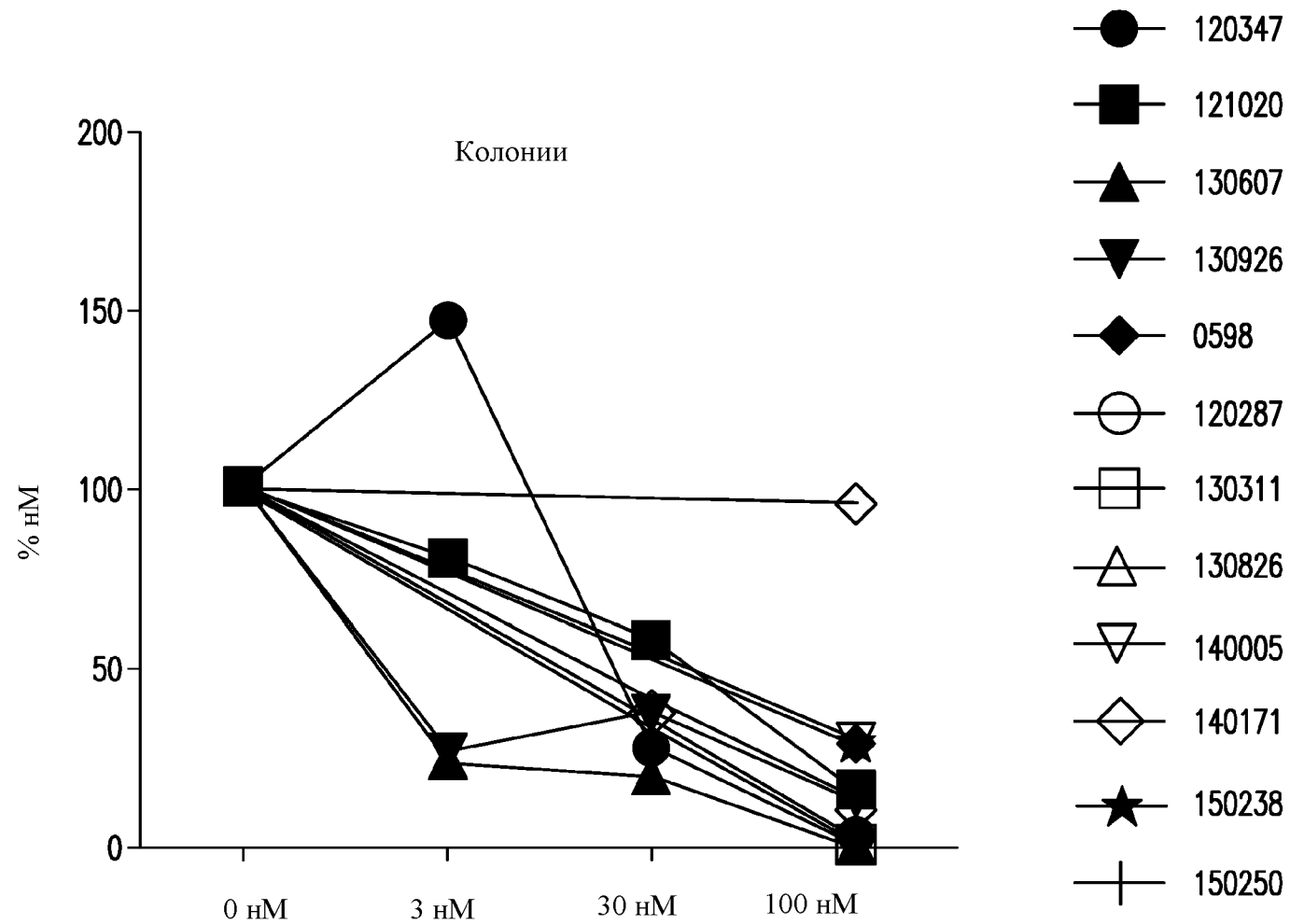
Фиг.15D



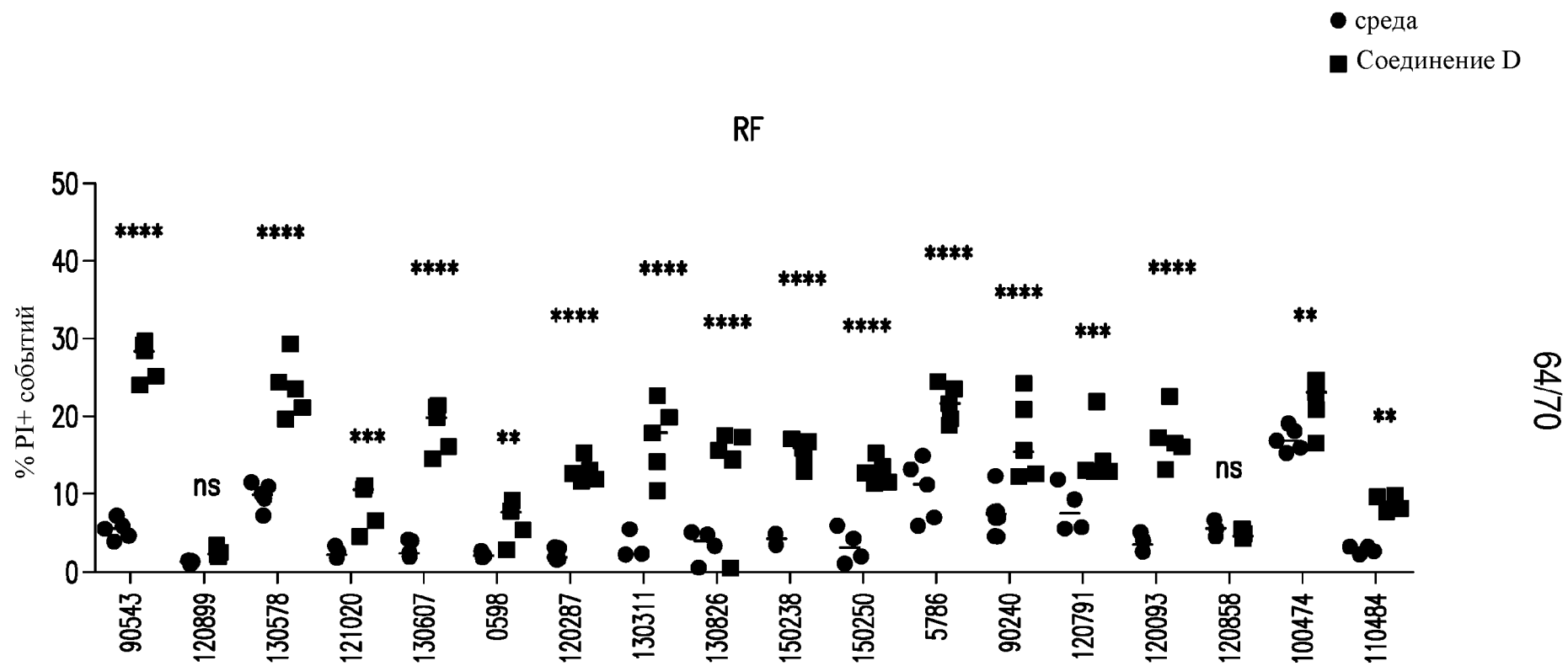




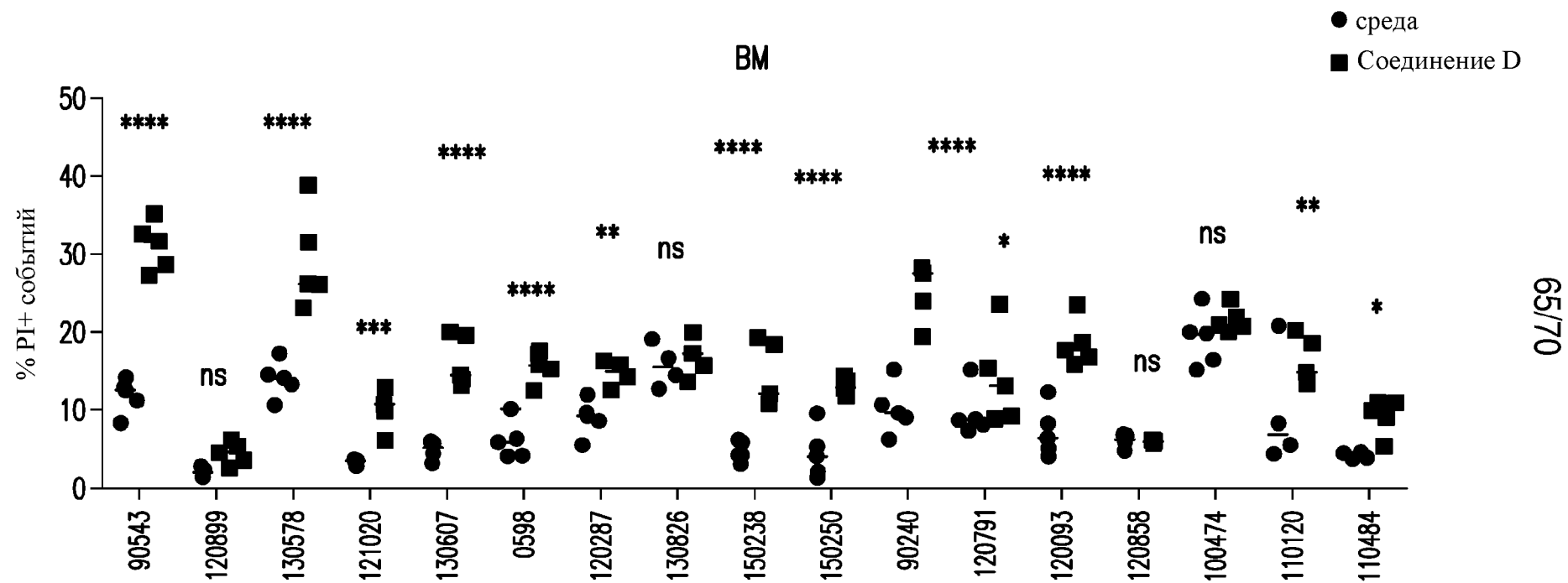
Фиг.16С



Фиг.16D

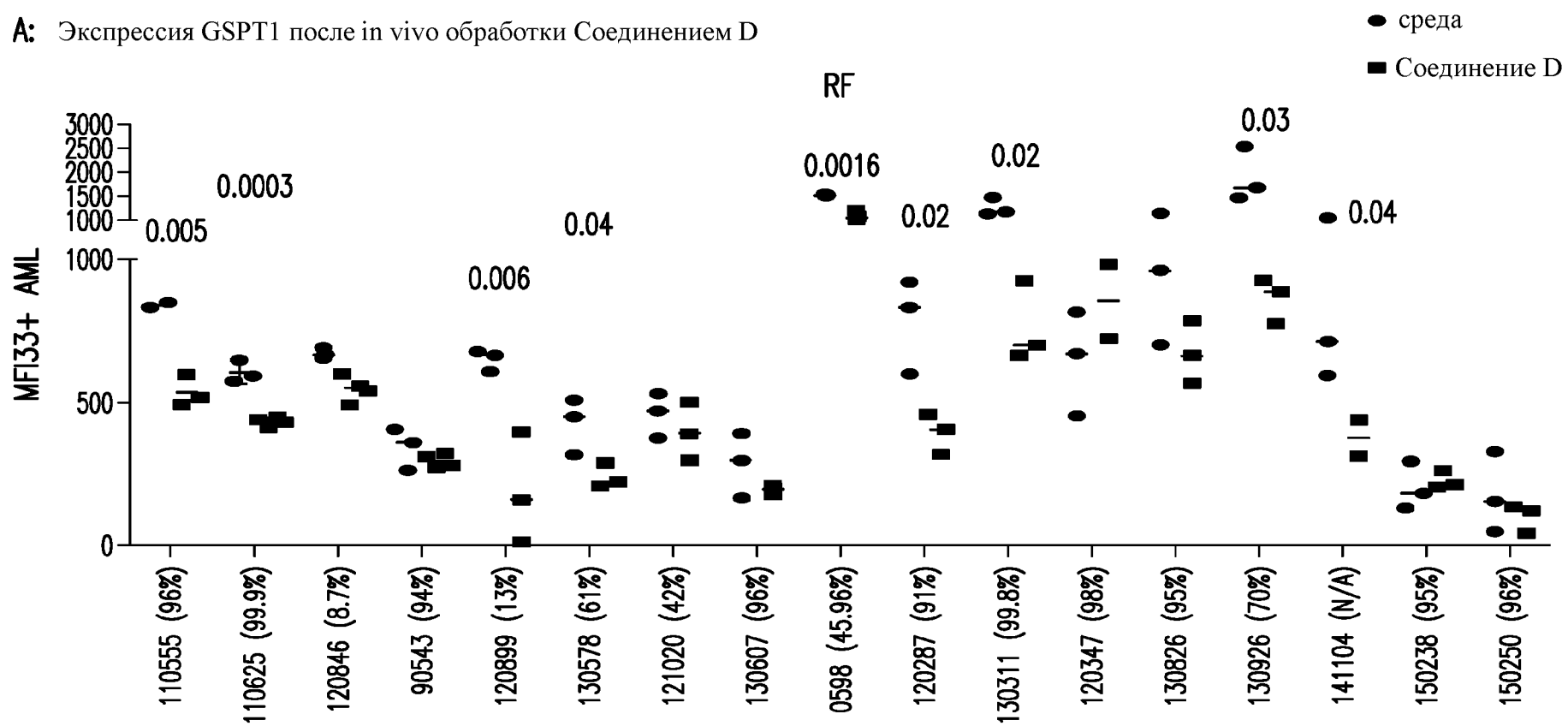


Фиг.17



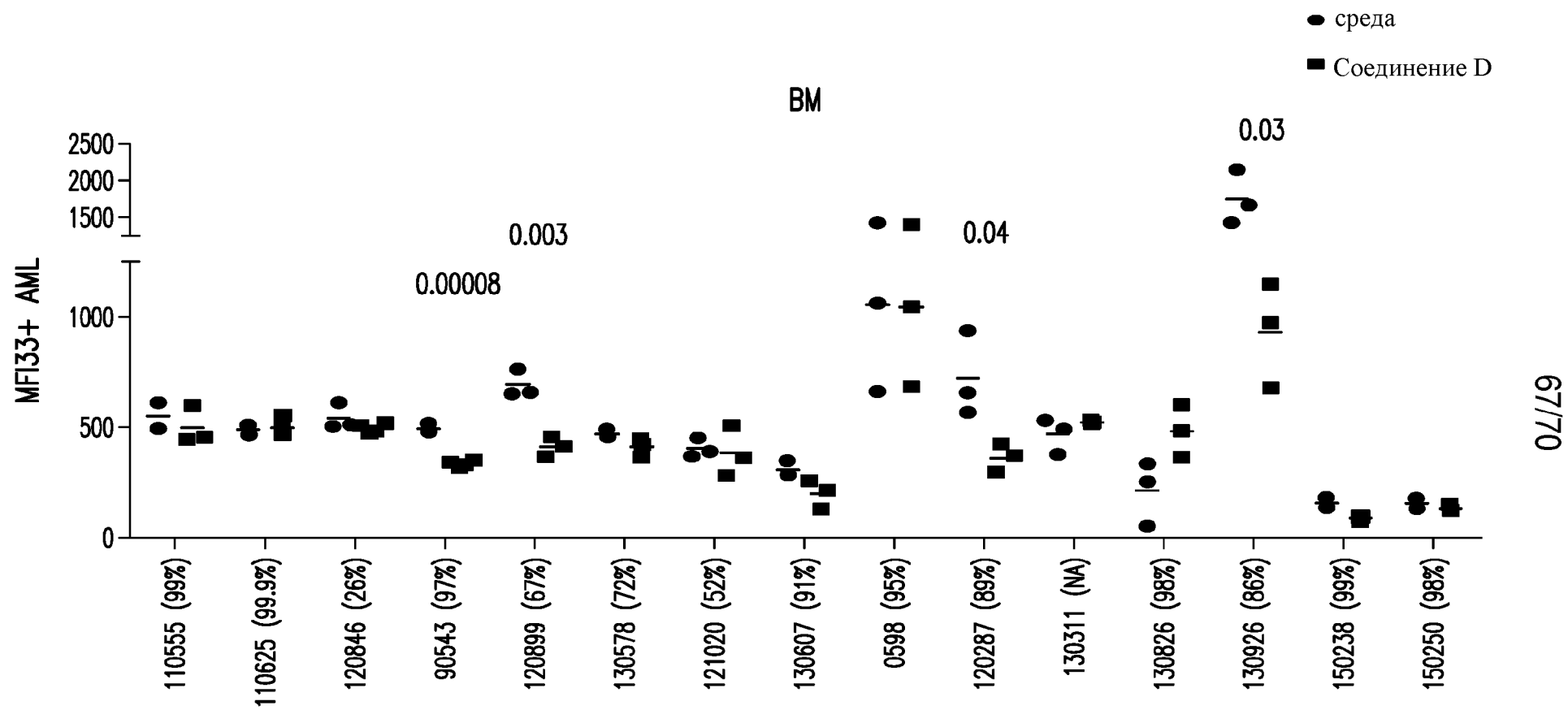
Фиг.17 (продолжение)

A: Экспрессия GSPT1 после *in vivo* обработки Соединением D



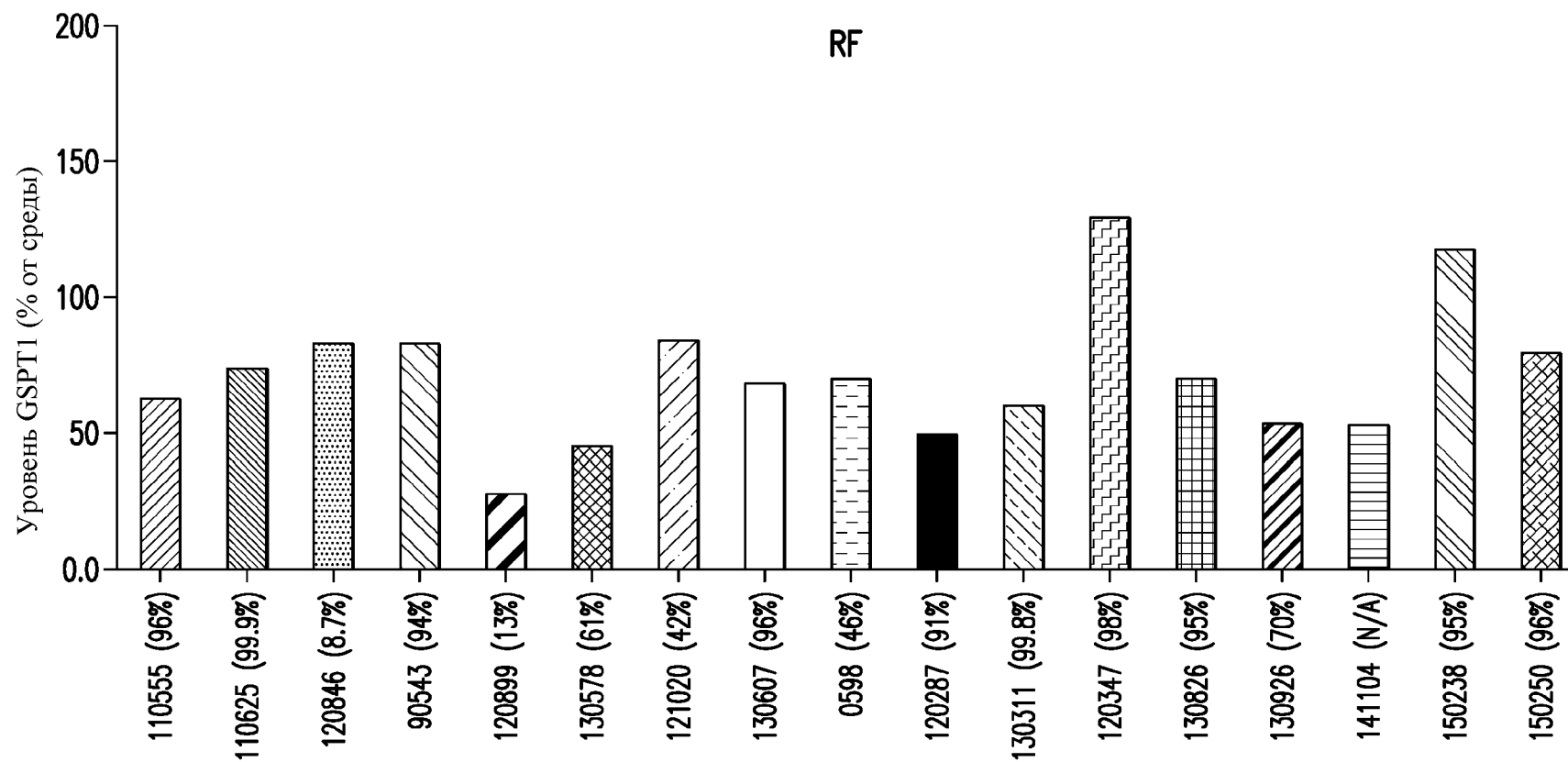
Фиг.18А

07/99

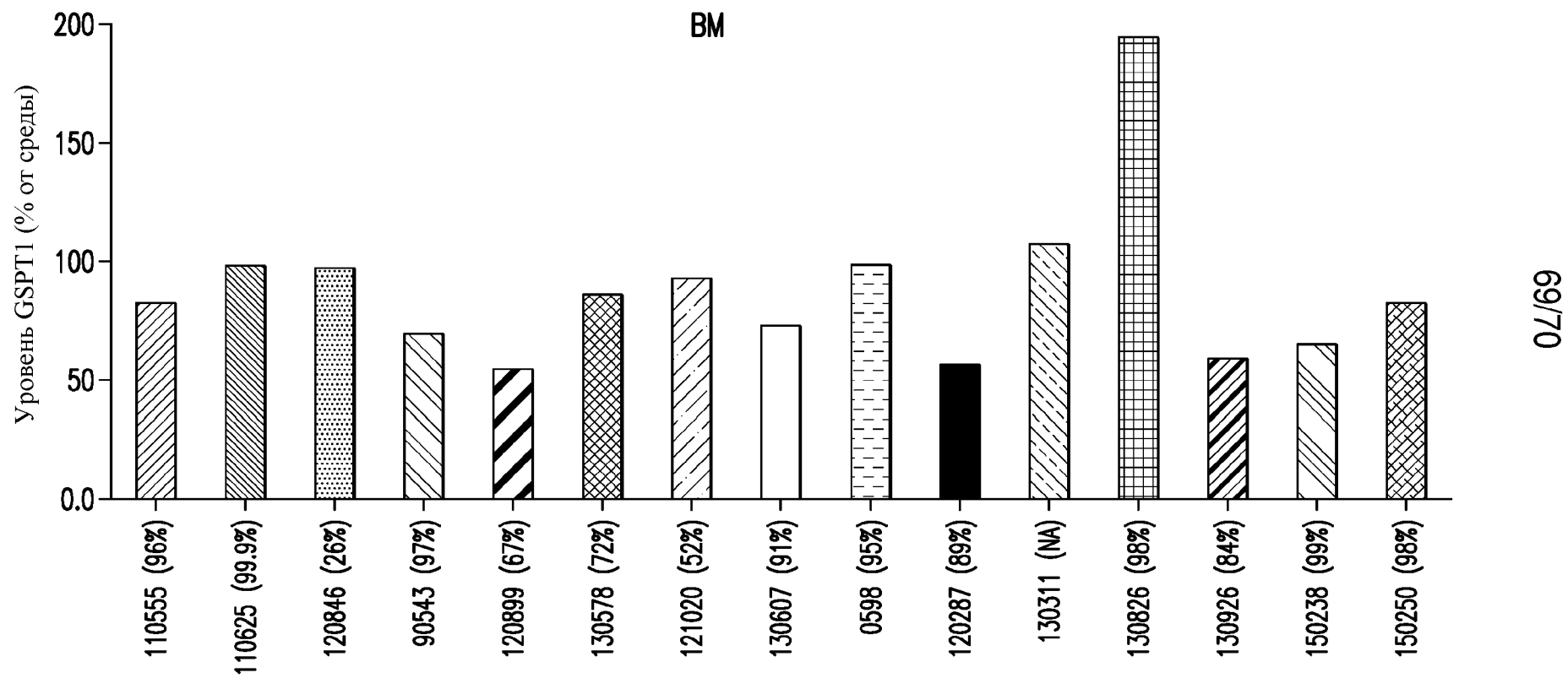


Фиг.18А (продолжение)

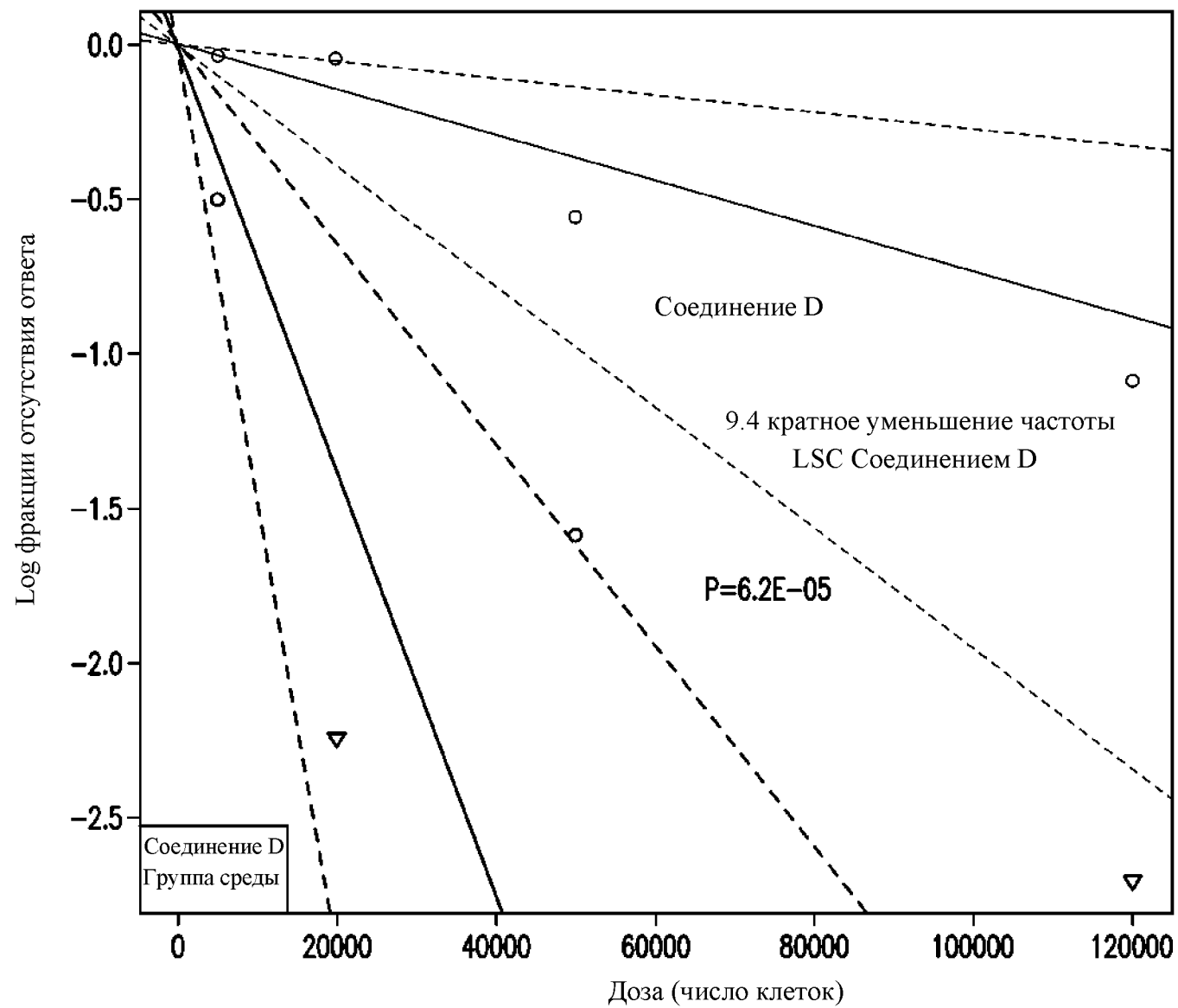
В: Относительное сокращение GSPT1 путем обработки Соединением D



Фиг.18В



Фиг.18В (продолжение)



Фиг. 19