

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291518** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.10.12

(51) Int. Cl. *C07D 401/14* (2006.01)  
*C07D 403/12* (2006.01)  
*C07D 403/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.11.23

(54) **СРЕДСТВА ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ, НАЦЕЛИВАЮЩИЕСЯ НА ЛЕГКИЕ, С ЛИПОСОМНЫМ АННАМИЦИНОМ**

(31) 62/938,845

(72) Изобретатель:

(32) 2019.11.21

**Прибе Вальдемар, Зелински Рафал,  
Фокт Изабела, Скора Станислав (US)**

(33) US

(86) PCT/US2020/061775

(74) Представитель:

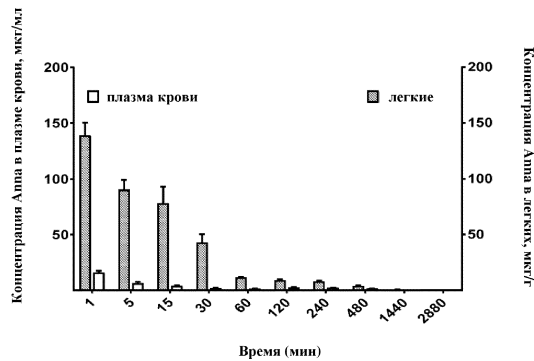
(87) WO 2021/102404 2021.05.27

**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**БОРД ОФ РЕДЖЕНТС, ЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕКСАС  
СИСТЕМ (US)**

(57) Предусмотрен способ лечения в отношении раковых клеток, локализованных в легком, посредством введения таким пациентам терапевтически эффективного количества состава на основе липосомного аннамицина (L-Ann).



**202291518  
A1**

**202291518  
A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575391EA/032

### СРЕДСТВА ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ, НАЦЕЛИВАЮЩИЕСЯ НА ЛЕГКИЕ, С ЛИПОСОМНЫМ АННАМИЦИНОМ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество заявки на патент США № 62/938845, поданной 21 ноября 2019 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[002] Аннамицин представляет собой некардиотоксичный антрациклиновый антибиотик с уникальными биологическими свойствами. Более ранние исследования авторов настоящего изобретения продемонстрировали, что аннамицин не обладает перекрестной устойчивостью с доксорубицином (DOX) и является плохим субстратом для Р-гликопротеина 1 (P-gp) [он же представитель 1 подсемейства В АТФ-связывающий кассеты (ABCВ1) или белок множественной устойчивости к лекарственным средствам 1 (MDR1)], основного механизма устойчивости к DOX при различных типах рака. Аннамицин, в отличие от DOX, достигает относительно высоких уровней накопления в клетке, особенно в линиях клеток с множественной устойчивостью к лекарственным средствам (MDR), и индуцирует значительное повреждение ДНК в раковых клетках, включая клетки с MDR. Клинически аннамицин вводится в липосомном составе (L-аннамицин), *in vivo* активность которого была продемонстрирована в различных опухолевых моделях.

[003] Исследования фармакокинетики и распределения в органах аннамицина и L-аннамицина, составленных в липосомах (L-аннамицин), позволили выявить высокие уровни аннамицина в легочной ткани. Уровни аннамицина (AUC, 24 ч) в легких были в более чем 10 раз выше, чем в плазме крови. Важно отметить, что высокая степень поглощения аннамицина легкими приводила к уровням, превышающим уровни DOX в 6-7 раз. Высокая степень внутриклеточного поглощения и уникальное распределение аннамицина могут частично быть причиной высокой активности L-аннамицина в отношении раковых клеток с MDR.

[004] Соответственно, предусмотрен способ лечения рака в легком, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества липосомного аннамицина.

[005] Эти и другие аспекты настоящего изобретения, раскрытого в данном документе, будут изложены более подробно по мере раскрытия патента.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[006] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации данного патента или заявки на патент с цветным(цветными) рисунком(рисунками) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[007] На приведенных ниже фигурах планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения; стрелки указывают на точки введения.

[008] На **фиг. 1** показан анализ РК и биораспределения аннамицина в легких и плазме крови после однократных внутривенных введений лекарственного средства. Планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM).

[009] На **фиг. 2-7** показаны прогрессирующие опухоли и выживаемость мышей с опухолью СТ26, обработанных L-аннамицином. Каждая из **фиг. 2-4 и 5** представляет собой лонгитюдный анализ сигнала BLI в случае мышей, обработанных с помощью L-App при двух различных уровнях дозирования: 2 мг/кг и 4 мг/кг. На **фиг. 6** показано распределение BLI в день 58 после имплантации опухоли. На **фиг. 7** показан анализ Каплана-Мейера (выживаемость в процентах) мышей с опухолью СТ26, обработанных L-аннамицином.

[010] На **фиг. 8** показаны прогрессирующие опухоли и выживаемость мышей с опухолью 4T1, обработанных L-аннамицином.

[011] На **фиг. 9** показан лонгитюдный анализ сигнала BLI в случае мышей с опухолью 4T1, обработанных с помощью L-App.

[012] На **фиг. 10** показан анализ Каплана-Мейера (выживаемость в процентах) мышей с опухолью 4T1, обработанных L-аннамицином.

#### Подробное описание

[013] В данном документе раскрыты способы лечения рака в легком (опухолей, локализованных в легком), включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества липосомного аннамицина.

[014] В определенных вариантах осуществления лечение рака в легком предусматривает одно или несколько из следующего: (a) увеличения времени выживания пациента; (b) уменьшения объема первичного рака; (c) замедления роста первичного рака; (d) уменьшения количества метастатических опухолей; (e) уменьшения объема метастатических опухолей и (f) замедления роста метастатических опухолей.

[015] В определенных вариантах осуществления лечение рака в легком не приводит к индуцированной аннамицином токсичности в отношении легкого такой степени тяжести, что повторное введение аннамицина противопоказано.

[016] В определенных вариантах осуществления лечение рака в легком не приводит к индуцированной аннамицином системной токсичности такой степени тяжести, что повторное введение аннамицина противопоказано.

[017] В определенных вариантах осуществления у пациента имеется первичный или метастатический рак в легком.

[018] В определенных вариантах осуществления у пациента имеется первичный рак в легком. В определенных вариантах осуществления виды первичного рака легкого представляют собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В определенных вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого выбран из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы и недифференцированного NSCLC.

[019] В определенных вариантах осуществления у пациента имеется

метастатический рак в легком. Виды метастатического рака легкого могут возникать практически в любой другой ткани и распространяться в легкое. Например, метастазированный рак может представлять собой рак молочной железы или толстой кишки. В определенных вариантах осуществления метастатический рак представляет собой метастаз первичного рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака головы и шеи, рака почки, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака яичника. В определенных вариантах осуществления метастатический рак представляет собой метастаз саркомы. В определенных вариантах осуществления метастатический рак происходит из рака неизвестного первичного происхождения.

[020] В определенных вариантах осуществления рак в легком представляет собой мезотелиому.

[021] Способы включают введение млекопитающему эффективного количества композиций на основе лекарственного средства. Стадия введения может представлять собой парентеральную и внутривенную, внутриартериальную, внутримышечную, внутрелимфатическую, интраперитонеальную, подкожную, внутривисцеральную, интратекальную инъекцию или может осуществляться посредством местного применения дозы. В некоторых вариантах осуществления такое введение осуществляется в повторном режиме до тех пор, пока не будет достигнута регрессия или исчезновение опухоли, и может быть использовано в сочетании с формами терапии опухолей, такими как хирургическое вмешательство или химиотерапия с применением различных средств.

[022] В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от примерно  $125 \text{ мг/м}^2$  до  $280 \text{ мг/м}^2$  по отношению к субъекту-млекопитающему, которому она вводится.

[023] В определенных вариантах осуществления введение повторяется еженедельно. В определенных вариантах осуществления введение повторяется один раз в две, три или четыре недели.

[024] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

[025] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство выбрано из актиномицина, афатиниба, алектиниба, аспарагиназы, азацитидина, азатиоприна, бикалутамида, блеомицина, бортезомиба, камптотецина, карбоплатина, капецитабина, цертиниба, цетуксимаба, цисплатина, хлорамбуцила, кризотиниба, циклофосфамида, цитарабина, даунорубицина, доцетаксела, доксифлуридина, доксорубицина, эрлотиниба, эпирубицина, эпотилона, этопозиды, флударабина, флутамина, фторурацила, фостаматиниба, гифитиниба, гемцитабина, гидроксимочевины, ибрутиниба, идарубицина, ифосфамида, иматиниба, ипилимумаба, иринотекана, лапатиниба, летрозол, мехлорэтамина, меркаптопурина, метотрексата, митомицина, митоксантрона, нилотиниба, октреотида, оксалиплатина, паклитаксела,

палбоциклиба, панитумумаба, пеметрекседа, ралтитрекседа, селуметиниба, сорафениба, сунитиниба, тамоксифена, темозоломида, тенипозиды, тиогуанина, топотекана, трастузумаба, тремелимумаба, валрубицина, вемурафениба, винбластина, винкристина, виндезина, винорелбина и их комбинаций.

[026] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство предусматривает комбинацию, выбранную из:

циклофосфида, доксорубина и винкристина;

митомицина, виндезина и цисплатина;

цисплатина и винорелбина, и

цисплатина, этопозиды и ифосфида.

[027] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного иммунотерапевтического средства. Примеры иммунотерапии включают без ограничения моноклональные антитела, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, противораковые вакцины и неспецифическую иммунотерапию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одно иммунотерапевтическое средство выбрано из хлорохина, гидроксихлорохина, пицибанила, крестина, шизофиллана, лентинана, убенимекса, интерферона, интерлейкина, макрофагального колониестимулирующего фактора, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, эритропоэтина, лимфотоксина, вакцины BCG, *Corynebacterium parvum*, левамизола, полисахарида К, прокодазола, антитела к CTLA4 (например, ипилимумаба, тремелимумаба), антитела к PD-1 (например, ниволумаба, пембролизумаба) и антитела к PD-L1.

[028] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает одно или оба из резекции рака легкого и проведения лучевой терапии.

[029] Аннамицин представлен в составе на основе липосом. В определенных вариантах осуществления липосомный аннамицин содержит аннамицин, один или несколько липидов и одно или несколько неионогенных поверхностно-активных веществ.

[030] Липид может предусматривать один или несколько фосфолипидов, которые образуют мицеллы и липидные бислои и широко используются для получения липосомных, этосомных и других наносоставов. Примеры подходящих фосфолипидов включают димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG).

[031] В определенных вариантах осуществления липиды предусматривают димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), и неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает поверхностно-активное вещество полисорбатного типа, образованное в результате этоксилирования сорбитана с последующим добавлением карбоновой кислоты.

[032] Неионогенные поверхностно-активные вещества обычно содержат ковалентно связанные кислородсодержащие гидрофильные группы, которые связаны с

гидрофобными исходными структурами. Неионогенное поверхностно-активное вещество может предусматривать поверхностно-активное вещество полисорбатного типа, образованное в результате этоксилирования сорбитана с последующим добавлением карбоновой кислоты, такой как монолаурат полиоксиэтиленсорбитана (например, полисорбат 20).

[033] В определенных вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает монолаурат полиоксиэтиленсорбитана.

[034] В определенных вариантах осуществления липосомный аннамицин представлен в виде композиции на основе прелипосомного лиофилизата, которая восстанавливается в водную композицию на основе липосом посредством гидратации, как описано, например, в US 7238366, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[035] В определенных вариантах осуществления прелипосомный лиофилизат аннамицина содержит:

1,8-2,2 мас. % аннамицина;

3,0-3,4 мас. % полисорбата 20 и

94,4-95,2 мас. % липидов, выбранных из DMPC и DMPG.

[036] В определенных вариантах осуществления количество DMPC составляет 65,3-67,3 мас. %, и количество DMPG составляет 27,1-29,9 мас. %.

[037] В определенных вариантах осуществления каждое из этих количеств может несколько варьироваться, например, на плюс или минус 10% от приведенного массового процента.

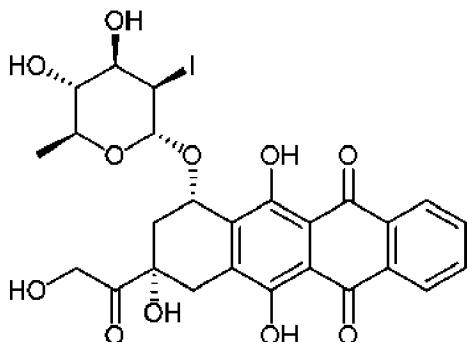
### **Определения**

[038] При раскрытии диапазонов значений и применении обозначения " $n_1$ - $n_2$ " или "от  $n_1$  ... до  $n_2$ ", где  $n_1$  и  $n_2$  представляют собой числа, если не указано иное, данное обозначение предназначено для включения самих чисел и диапазона между ними. Данный диапазон может состоять из целых чисел или непрерывного ряда значений и включать конечные значения. В качестве примера диапазон "от 2 до 6 атомов углерода" предназначен для включения двух, трех, четырех, пяти и шести атомов углерода, поскольку атомы углерода существуют в виде целых единиц. Для сравнения, в качестве примера, диапазон "от 1 до 3 мкМ (микромольный)", который предназначен для включения 1 мкМ, 3 мкМ и всех значений между ними с любым количеством значащих цифр (например, 1,255 мкМ, 2,1 мкМ, 2,9999 мкМ и т. д.).

[039] Термин "приблизительно", используемый в данном документе, предназначен для количественного определения числовых значений, которые он модифицирует, обозначая такое значение как переменную в пределах ошибки. Если не указаны конкретные пределы ошибки, такие как стандартное отклонение от среднего значения, приведенные на графике или в таблице данных, то следует понимать, что термин "приблизительно" следует понимать как означающий диапазон, который охватывал бы указанное значение, и также диапазон, который был бы включен при округлении до

данной цифры, учитывая значащие цифры.

[040] Термин "аннамицин" следует понимать как означающий соединение (7S,9S)-7-(((2R,3R,4R,5R,6S)-4,5-дигидрокси-3-йод-6-метилтетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-6,9,11-тригидрокси-9-(2-гидроксиацетил)-7,8,9,10-тетрагидротетрацен-5,12-дион, характеризующееся следующей структурой:



[041] Термин "прелипосомный лиофилизат аннамицина высокой степени чистоты" следует понимать как означающий чистоту материала, составляющую не менее 95% аннамицина, согласно анализу посредством HPLC с применением проверенного стандартного образца. В некоторых вариантах осуществления аннамицин характеризуется чистотой, составляющей по меньшей мере 96%, или чистотой, составляющей по меньшей мере 97%, или чистотой, составляющей по меньшей мере 98%, или чистотой, составляющей по меньшей мере 99%.

[042] Термин "липосомы", "липосомный" и т. п. следует понимать как означающий, как правило, сферические структуры, содержащие липиды, жирные кислоты, структуры типа липидного бислоя, однослойные везикулы и аморфные липидные везикулы. Классически липосомы представляют собой полностью замкнутые мембраны из липидного бислоя, содержащие захваченный водный объем. Липосомы предусматривают неклассические формы, где аннамицин может находиться внутри бислоя, представлять собой часть бислоя и быть абсорбирован на бислое. Липосомы могут представлять собой однослойные везикулы (обладающие одной мембраной из бислоя) или многослойные везикулы ("луковичные" структуры, характеризующиеся несколькими мембранными бислоями, каждый из которых отделен от следующего водным слоем). Бислой состоит из двух липидных монослоев, содержащих гидрофобную область "хвоста" и гидрофильную область "головки". Структура мембранного бислоя такова, что гидрофобные (неполярные) "хвосты" липидных монослоев ориентированы к центру бислоя, в то время как гидрофильная "головка" ориентирована к водной фазе.

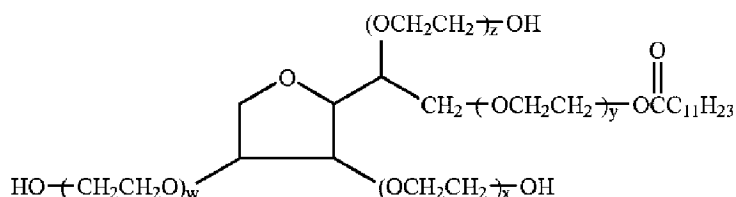
[043] Термин "лиофилизат прелипосом" и "прелипосомный лиофилизат" следует понимать как означающий неводный материал, который будет образовывать липосомы при добавлении водного раствора. В некоторых вариантах осуществления неводный материал представляет собой сухой (например, нежидкий, негелеобразный) материал. Лиофилизат широко используется для включения сухого остатка, полученного в результате сублимации замороженных жидкостей из нелетучих материалов, остатка,

полученного в результате ротационного выпаривания и подобных процедур, и сухих композиций, которые при добавлении водной фазы (с перемешиванием или без него) приводят к образованию липосом. В частности, следует понимать, что "лиофилизат прелипосом" не находится в липосомной форме после лиофилизации.

[044] Термин "липиды" относится к любому классу фармацевтически приемлемых органических соединений, которые представляют собой жирные кислоты или их производные. В некоторых вариантах осуществления липиды представляют собой фосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, включая DMPC и DPMG, но также могут предусматривать другие липиды, такие как яичный фосфатидилэтаноламин.

[045] Термин "неионогенные поверхностно-активные вещества" относится к фармацевтически приемлемым поверхностно-активным веществам, которые содержат ковалентно связанные кислородсодержащие гидрофильные группы, которые связаны с гидрофобными исходными структурами. Подходящие неионогенные поверхностно-активные вещества предусматривают этоксилаты, этоксилаты жирных спиртов, алкилфенолэтоксилаты, этоксилаты жирных кислот, этоксилированные сложные эфиры жирных кислот и масла, этоксилированные амины, амиды жирных кислот, терминально блокированные этоксилаты, полуксамеры, сложные эфиры жирных кислот и полигидроксисоединений, сложные эфиры жирных кислот и глицерина и сложные эфиры жирных кислот и сорбита. В некоторых вариантах осуществления неионогенные поверхностно-активные вещества представляют собой поверхностно-активные вещества полисорбатного типа, образованные в результате этоксилирования сорбитана с последующим добавлением карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает монолаурат полиоксиэтиленсорбитана (полисорбат 20) и полиэтоксилированную сорбитанмоноолеиновую кислоту (полисорбат 80).

[046] "Полисорбат 20" относится к коммерчески доступному неионогенному поверхностно-активному веществу (ICI Americas Inc.), состоящему из смеси цепей полиоксиэтилена различной длины, связанных с обычным сорбитановым сахаром. Эти полиоксиэтиленовые сахара также связаны с жирной кислотой. Торговое наименование данного материала - Tween™ 20; композиция представляет собой монолаурат полиоксиэтиленсорбитана (MW составляет примерно 1300). Поскольку полисорбат 20 показан ниже,  $w + x + y + z = 20$ .



[047] Термин "фармацевтически приемлемая кислота" относится к любой органической и неорганической кислоте, которая известна из уровня техники как хорошо переносимая и подходящая для введения пациентам-людям. Такие соли предусматривают



1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,2-дихлоруксусную кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту, 2-оксоглутаровую кислоту, 4-ацетамидобензойную кислоту, 4-аминосалициловую кислоту, уксусную кислоту, адипиновую кислоту, аскорбиновую кислоту (L), аспарагиновую кислоту (L), бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, камфорную кислоту (+), камфор-10-сульфоновую кислоту (+), каприновую кислоту (декановую кислоту), капроновую кислоту (гексановую кислоту), каприловую кислоту (октановую кислоту), угольную кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, цикламовую кислоту, додецилсерную кислоту, этан-1,2-дисульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, галактаровую кислоту, гентизиновую кислоту, глюкогептоновую кислоту (D), глюконовую кислоту (D), глюкуроновую кислоту (D), глутаминовую кислоту, глутаровую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, гиппуровую кислоту, бромистоводородную кислоту, хлористоводородную кислоту, изомаляную кислоту, молочную кислоту (DL), лактобионовую кислоту, лауриновую кислоту, малеиновую кислоту, яблочную кислоту (-L), малоновую кислоту, миндальную кислоту (DL), метансульфоновую кислоту, нафталин-1,5-дисульфоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, азотную кислоту, олеиновую кислоту, щавелевую кислоту, пальмитиновую кислоту, палмовую кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, пироглутаминовую кислоту (-L), салициловую кислоту, себациновую кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, винную кислоту (+L), тиоциановую кислоту, толуолсульфоновую кислоту (*n*), ундециленовую кислоту. Фармацевтически приемлемые кислоты предусматривают хлористоводородную кислоту и серную кислоту.

[048] Подразумевается, что термин "заболевание", используемый в данном документе, является в целом синонимичным и используется взаимозаменяемо с терминами "нарушение", "синдром" и "состояние" (т. е. медицинское состояние) в том, что все они отражают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, что ухудшает нормальное функционирование, при этом оно обычно проявляется посредством отличительных признаков и симптомов и приводит к сокращению продолжительности или ухудшению качества жизни человека или животного.

[049] Термин "пациент" в целом является синонимичным термину "субъект" и включает всех млекопитающих, в том числе людей. Предпочтительно пациент является человеком.

[050] Фраза "терапевтически эффективный" предназначена для количественного определения количества активных ингредиентов, используемых в лечении заболевания или нарушения или при влиянии на клинический конечный результат.

[051] Термин "терапевтически приемлемый" относится к таким соединениям (или солям, пролекарствам, таутомерам, цвиттер-ионным формам и т. п.), которые являются подходящими для применения в контакте с тканями пациентов без нежелательных

токсичности, раздражения и аллергического ответа, являются соизмеримыми с обоснованным соотношением польза/риск и являются эффективными в отношении их предполагаемого применения.

[052] В определенных вариантах осуществления ссылка на "осуществление лечения" или "лечение" субъекта с риском развития заболевания или с риском прогрессирования заболевания до худшего состояния предназначена для включения профилактики. Например, предупреждение заболевания может не означать полное устранение какого-либо эффекта, связанного с заболеваниями на любом уровне, но вместо этого может означать предупреждение симптомов заболевания до клинически значимого или выявляемого уровня. Предупреждение заболеваний также может означать предупреждение прогрессирования заболевания до следующей стадии заболевания.

[053] Термин "комбинированная терапия" означает введение двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения. Такое введение охватывает совместное введение данных терапевтических средств практически одновременно, например, в одной капсуле, содержащей фиксированное соотношение активных ингредиентов, или в нескольких отдельных капсулах для каждого активного ингредиента. Кроме того, такое введение также охватывает применение каждого типа терапевтического средства последовательно. В любом случае схема лечения обеспечит благоприятные эффекты комбинации лекарственных средств в лечении состояний или нарушений, описанных в данном документе.

[054] Если комбинированная терапия проводится "одновременно", это предусматривает лечение пациента одной лекарственной формой (например, таблеткой), содержащей как липосомный аннамицин, так и дополнительное противораковое вещество, а также одновременное введение дозы отдельных лекарственных форм, каждая из которых отдельно содержит один из соответствующих партнеров по комбинации.

[055] Если комбинированная терапия проводится "последовательно" или "раздельно", это предусматривает лечение пациента первой лекарственной формой липосомного аннамицина с последующим лечением того же пациента второй лекарственной формой, содержащей дополнительное противораковое вещество, или лечение пациента одной лекарственной формой, содержащей конкретное противораковое вещество, с последующим лечением того же пациента второй лекарственной формой, содержащей липосомный аннамицин. Интервал между последовательными или отдельными дозами может быть оценен опытным практикующим врачом со ссылкой на информацию, содержащуюся в данном описании.

[056] Дополнительные варианты осуществления включают варианты осуществления, раскрытые в следующих примерах, которые никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие.

### *Примеры*

[057] **Пример 1. Определение фармакокинетики и биораспределения L-аннамицина у самок мышей CD-1**

[058] Фармакокинетику и биораспределение L-аннамицина исследовали на самках мышей CD-1 после однократной болюсной инъекции L-аннамицина при 4 мг/кг. Животных подвергали эвтаназии в несколько временных точек (n равняется 5-8) с последующим сбором крови и извлечением следующих органов: легких, почек, печени, сердец, головного мозга, поджелудочной железы и селезенки. Ткани мышечной гомогенизировали при 100 мг/мл в метаноле. Затем гомогенат тканей экстрагировали посредством осаждения белка с применением 10x объема ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты. Значения концентрации аннамицина в плазме крови и лизатах тканей определяли с применением LC/MS/MS. Образцы анализировали с применением масс-спектрометра Waters QuattroPremier XE и UPLC на колонке Waters Acquity Classic. Выявление проводили с применением ионизации отрицательно заряженных ионов посредством электрораспыления. Аннамицин хроматографически отделяли с применением колонки Phenomenex Luna с фенилгексилем, 3 мкм, 2,1×150 мм, с применением линейного градиента воды и ацетонитрила, оба из которых содержат 0,1% муравьиной кислоты.

[059] На **фигуре 1** представлены уровни аннамицина в плазме крови и легких в различные временные точки после введения L-аннамицина. Уровни лекарственного средства в легких и плазме крови, выявленные через одну минуту после инъекции, составляли 138,7 мкг/г и 15,86 мкг/мл соответственно, что соответствует 216 мкМ и 25 мкМ, что является неожиданным результатом. Значительно более высокие уровни аннамицина в легких, чем в плазме крови, были выявлены на протяжении всего исследования с самым высоким соотношением 28,7, зарегистрированным через 30 минут после введения лекарственного средства. На **фиг. 1** показан анализ РК и биораспределения аннамицина после однократных внутривенных введений лекарственного средства.

[060] **Пример 2. Эффективность L-аннамицина в сингенной модели СТ26 рака толстой кишки с "метастазами в легкие"**

[061] Эффективность L-аннамицина (L-Ann) тестировали на мышцах Balb/c, которым посредством внутривенной инъекции вводили клетки СТ26. Самкам мышечной Balb/c (в возрасте 8 недель) посредством iv инъекции вводили  $2,5 \times 10^5$  клеток СТ26WT-Luc-neo в 200 мкл PBS. Мониторинг прогрессирования опухоли осуществляли с применением BLI. Биоломинесцентные сигналы получали через 10 минут после подкожного введения D-люциферина (100 мкл при 15 мг/мл) с применением устройства для визуализации IVIS Lumina 100 (FOV равняется 25, F1, биннинг 8, время автоматической экспозиции). Параметры BLI были неизменными в течение всего исследования. Изображения анализировали с применением программного обеспечения Living Image версии 4.5.5. Для количественной оценки в качестве ROI использовали всю поверхность тела мыши и использовали единицу нормализованной интенсивности излучения (ф/сек/см<sup>2</sup>/ср).

[062] В день 17 мышечной рандомизировали на три группы (n равняется 11-12),

которые получали среду-носитель или L-Anna при 2 мг/кг или 4 мг/кг (4 и 8 мл/кг соответственно) при введении внутривенно один раз в неделю (5 доз в целом). Вводимый объем корректировали индивидуально в зависимости от веса тела. Осуществляли мониторинг роста опухоли с применением BLI-визуализации один раз в неделю. Для непрерывного BLI-анализа допускали применение максимального зарегистрированного сигнала BLI в случае мертвых мышей. Распределение сигналов между группами анализировали с применением критерия Краскела-Уоллиса.

[063] Прогрессирование опухоли и выживаемость мышей с опухолью СТ26, обработанных L-аннамицином, показаны на фиг. 2-4. На основании биолюминесцентной визуализации (BLI) мыши демонстрировали преимущественно опухоли, локализованные в легких, как показано на **фиг. 2-4** Наблюдалась дозозависимая задержка прогрессирования опухоли у мышей, обработанных с помощью L-Ann при 2 мг/кг и 4 мг/кг. У мышей, получавших L-Ann по схеме 4 мг/кг, наблюдалась устойчивая регрессия опухоли. **На фиг. 2-4 и 5** представлен лонгитюдный анализ сигнала BLI в случае мышей, обработанных с помощью L-Ann при двух различных уровнях дозирования: 2 мг/кг и 4 мг/кг. **На фигуре 6** показано распределение BLI в день 58 после имплантации опухоли. Подавление роста опухоли явно приводило к улучшению выживаемости мышей: медианная выживаемость мышей, обработанных средой-носителем, составляла 46 дней. Ни в одной из групп, получающих 2 мг/кг или 4 мг/кг, не был достигнут уровень смертности, позволяющий установить показатель медианной выживаемости; на **фиг. 7** показана выживаемость в процентах, определенная посредством анализа Каплана-Мейера, у мышей с опухолью СТ26, обработанных с помощью L-аннамицина. Следует отметить, что в группе, обработанной с помощью 4 мг/кг, до дня 58 исследования не было зарегистрировано случаев смерти. В данном эксперименте медианная выживаемость достигала 117,5 дней.

**Пример 3. Эффективность L-аннамицина в сингенной модели 4T1 трижды негативного рака молочной железы с "метастазами в легкие"**

[064] Эффективность L-аннамицина (L-Ann) тестировали на мышах Balb/c, которым посредством внутривенной инъекции вводили клетки 4T1. Самкам мышей Balb/c посредством iv инъекции вводили  $2 \times 10^4$  клеток 4T1-Luc. Осуществляли мониторинг роста опухоли с применением BLI-визуализации один раз в неделю. Биолюминесцентные сигналы получали через 10 минут после подкожного введения D-люциферина (100 мкл при 15 мг/мл) с применением устройства для визуализации IVIS Lumina 100 (FOV равняется 25, F1, биннинг 8, время автоматической экспозиции). Параметры BLI были неизменными в течение всего исследования. Изображения анализировали с применением программного обеспечения Living Image версии 4.5.5. Для количественной оценки в качестве ROI использовали всю поверхность тела мыши и использовали единицу нормализованной интенсивности излучения (ф/сек/см<sup>2</sup>/ср).

[065] Обработка, начатая через 8 дней после инокуляции, предусматривала 6 доз L-Ann по 4 мг/кг, вводимых один раз в неделю. В день 8 мышей рандомизировали на две группы (n равняется 10), получающие среду-носитель (солевой раствор при 8 мл/кг) или

L-Анна при 4 мг/кг (8 мл/кг). Для непрерывного BLI-анализа допускали применение максимального зарегистрированного сигнала BLI в случае мертвых мышей. Кривые выживаемости анализировали с применением анализа Каплана-Мейера. Р-значения рассчитывали с применением логрангового критерия (Мантеля-Кокса) в Graph Pad Prism.

[066] На основании биолюминесцентной визуализации (BLI) мыши демонстрировали преимущественно опухоли, локализованные в легких (**фиг. 8**). Наблюдалась отчетливая задержка прогрессирования опухоли у мышей, обработанных с помощью L-Ann. Обработанная группа демонстрировала значительно более низкий биолюминесцентный сигнал по сравнению с животными, получающими среду-носитель, уже через 8 дней после введения первой дозы ( $p$  равняется 0,046), и разница продолжает повышаться на протяжении всего исследования (**фиг. 8** и **фиг. 9**). Важно отметить, что снижение роста опухоли коррелировало с улучшением выживаемости: медианная выживаемость группы, обработанной средой-носителем, составляла 23 дня, тогда как в случае мышей, обработанных с помощью L-Ann, она повышалась до 53 дней (коэффициент выживаемости 2,26,  $p$  меньше 0,0001, **фиг. 10**).

#### **Пример 4. Эффективность L-аннамицина в модели саркомы MCA205 RFP**

[067] Эффективность L-аннамицина (L-Ann) тестировали на мышах Balb/c, которым посредством внутривенной инъекции вводили клетки MCA205. Самкам мышей Balb/c посредством *iv* инъекции вводили  $1 \times 10^5$  клеток MCA205.

[068] Обработка, начатая через 4 дня после инокуляции, предусматривала 4 мг/кг L-Ann, вводимых один раз в неделю. В день 4 мышей рандомизировали на две группы ( $n$  равняется 10), получающие среду-носитель (солевой раствор при 8 мл/кг) или L-Анна при 4 мг/кг (8 мл/кг). Кривые выживаемости анализировали с применением анализа Каплана-Мейера. Р-значения рассчитывали с применением логрангового критерия (Мантеля-Кокса) в Graph Pad Prism.

[069] Наблюдалась отчетливая задержка прогрессирования опухоли у мышей, обработанных с помощью L-Ann. Важно отметить, что снижение роста опухоли коррелировало с улучшением выживаемости: медианная выживаемость группы, обработанной средой-носителем, составляла 21 дня, тогда как в случае мышей, обработанных с помощью L-Ann, она повышалась до 87,5 дней (выживаемость 417% (% по сравнению с контролем),  $p$  меньше 0,0001).

#### **Краткое описание**

[070] Как показано в данном документе, аннамицин быстро накапливается в легких, и у мышей CD-1, получающих однократную болюсную инъекцию L-аннамицина при 4 мг/кг, был достигнут высокий уровень аннамицина в легких всего через 1 минуту после инъекции. Значительно более высокие уровни аннамицина были выявлены в легких, чем в плазме крови, на протяжении всего исследования, с самым высоким соотношением 28,7, зарегистрированным через 30 минут после введения лекарственного средства. См. пример 1 и **фиг. 1**. Аннамицин не только накапливается в легких, но и значительно снижает рост опухоли и улучшает выживаемость в трех сингенных мышинных моделях

рака с "метастазами в легкие", как дополнительно обсуждается в примере 2 (рак толстой кишки СТ26), примере 3 (трижды негативный рак молочной железы 4Т1) и примере 4 (саркома МСА205).

[071] Все ссылки, патенты или патентные заявки США или других стран, цитируемые в данной заявке, настоящим включены посредством ссылки, как если бы они были описаны в данном документе во всей своей полноте. В случае возникновения любых несоответствий, материал, раскрытый в данном документе, имеет преимущественную силу.

[072] Из предшествующего описания специалист в данной области техники может легко установить основные характеристики настоящего изобретения и без отступления от его сущности и объема может внести различные изменения и осуществить модификации настоящего изобретения с целью его адаптации к различным вариантам применения и способам.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака в легком, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества липосомного аннамицина.

2. Способ по п. 1, где у указанного пациента имеется первичный или метастатический рак в легком.

3. Способ по п. 2, где первичный рак легкого представляет собой немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC) или мелкоклеточную карциному легкого (SCLC).

4. Способ по п. 3, где первичный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, выбранный из аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы и крупноклеточной карциномы.

5. Способ по п. 2, где у указанного пациента имеется метастатический рак в легком.

6. Способ по п. 5, где метастатический рак представляет собой метастаз первичного рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака головы и шеи, рака почки, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака яичника.

7. Способ по п. 5, где метастатический рак представляет собой метастаз саркомы.

8. Способ по п. 5, где метастатический рак происходит от рака неизвестного первичного происхождения.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

10. Способ по п. 9, где по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство выбрано из актиномицина, афатиниба, алектиниба, аспарагиназы, азациитидина, азатиоприна, бикалутамида, блеомицина, бортезомиба, камптотецина, карбоплатина, капецитабина, цертиниба, цетуксимаба, цисплатина, хлорамбуцила, кризотиниба, циклофосамида, цитарабина, даунорубицина, доцетаксела, доксифлуридина, доксорубицина, эрлотиниба, эпирубицина, эпотилона, этопозиды, флударабина, флутамина, фторурацила, фостаматиниба, гефитиниба, гемцитабина, гидроксимочевины, ибрутиниба, идарубицина, ифосфамида, иматиниба, ипилимумаба, иринотекана, лапатиниба, летрозолы, мехлорэтамина, меркаптопурина, метотрексата, митомицина, митоксантрона, нилотиниба, октреотида, оксалиплатина, паклитаксела, палбоциклиба, панитумумаба, пеметрекседа, ралтитрекседа, селуметиниба, сорафениба, сунитиниба, тамоксифена, темозоломида, тенипозиды, тиогуанина, топотекана, трастузумаба, тремелимумаба, валрубицина, вемурафениба, винбластин, винкристина, виндезина, винорелбина и их комбинаций.

11. Способ по п. 9, где по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство предусматривает комбинацию, выбранную из:

циклофосамида, доксорубицина и винкристина;

митомицина, виндезина и цисплатина;

цисплатина и винорелбина, и  
цисплатина, этопозид и ифосфамида.

12. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного иммунотерапевтического средства.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий одно или оба из резекции рака легкого и проведения лучевой терапии.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лечение рака в легком предусматривает одно или несколько из следующего: (a) увеличения времени выживания пациента; (b) уменьшения объема первичного рака; (c) замедления роста первичного рака; (d) уменьшения количества метастатических опухолей; (e) уменьшения объема метастатических опухолей и (f) замедления роста метастатических опухолей.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лечение рака в легком не приводит к индуцированной аннамицином токсичности в отношении легкого такой степени тяжести, что повторное введение аннамицина противопоказано.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где лечение рака в легком не приводит к индуцированной аннамицином системной токсичности такой степени тяжести, что повторное введение аннамицина противопоказано.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанное введение повторяют еженедельно.

18. Способ по любому из пп. 1-16, где указанное введение повторяют один раз в две, три или четыре недели.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где липосомный аннамицин содержит аннамицин, один или несколько липидов и одно или несколько неионогенных поверхностно-активных веществ.

20. Способ по п. 19, где липиды предусматривают димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG).

21. Способ по п. 19 или п. 20, где неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает поверхностно-активное вещество полисорбатного типа, образованное в результате этоксилирования сорбитана с последующим добавлением карбоновой кислоты.

22. Способ по п. 21, где неионогенное поверхностно-активное вещество предусматривает монолаурат полиоксиэтиленсорбитана.

23. Способ по любому из предыдущих пунктов, где липосомный аннамицин представлен в виде композиции на основе прелипосомного лиофилизата, которую перед введением восстанавливают в водную композицию на основе липосом посредством гидратации.

24. Способ по п. 23, где прелипосомный лиофилизат аннамицина содержит:

1,8-2,2 мас. % аннамицина;

3,0-3,4 мас. % полисорбата 20 и

94,4-95,2 мас. % липидов, выбранных из DMPC и DMPG.

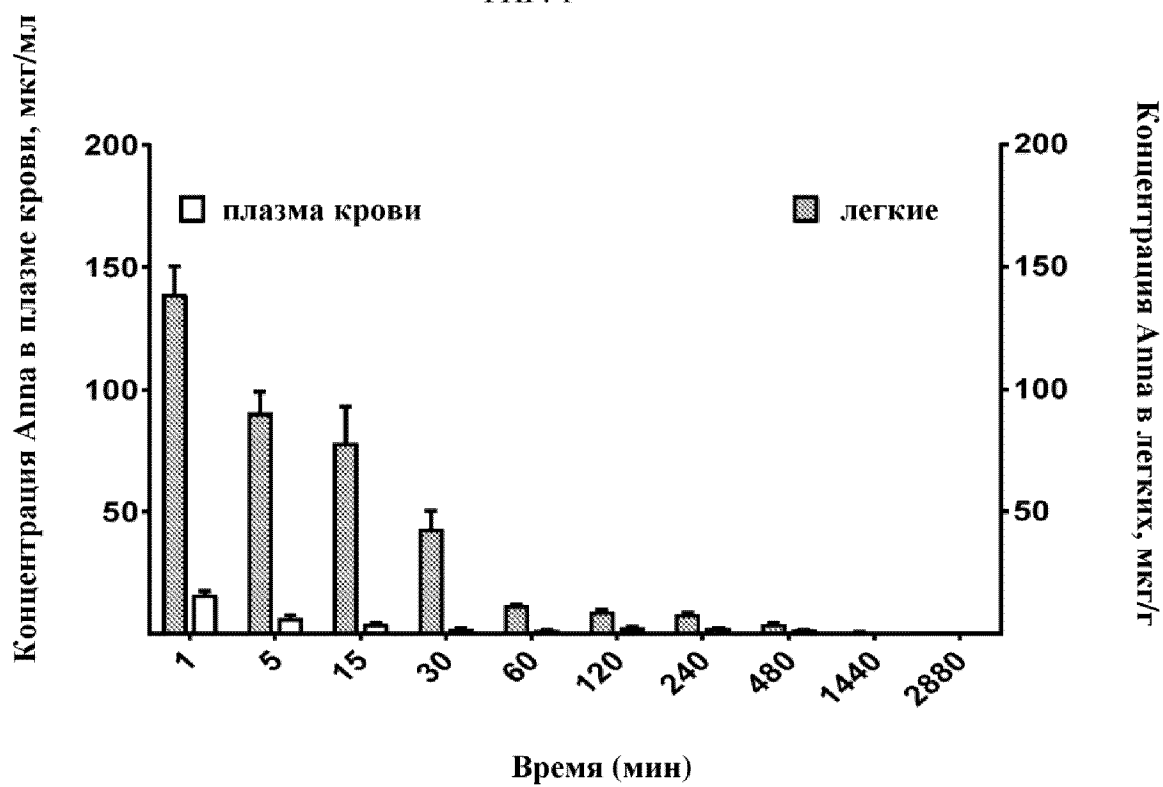
25. Способ по п. 24, где количество DMPC составляет 65,3-67,3 мас. %, и



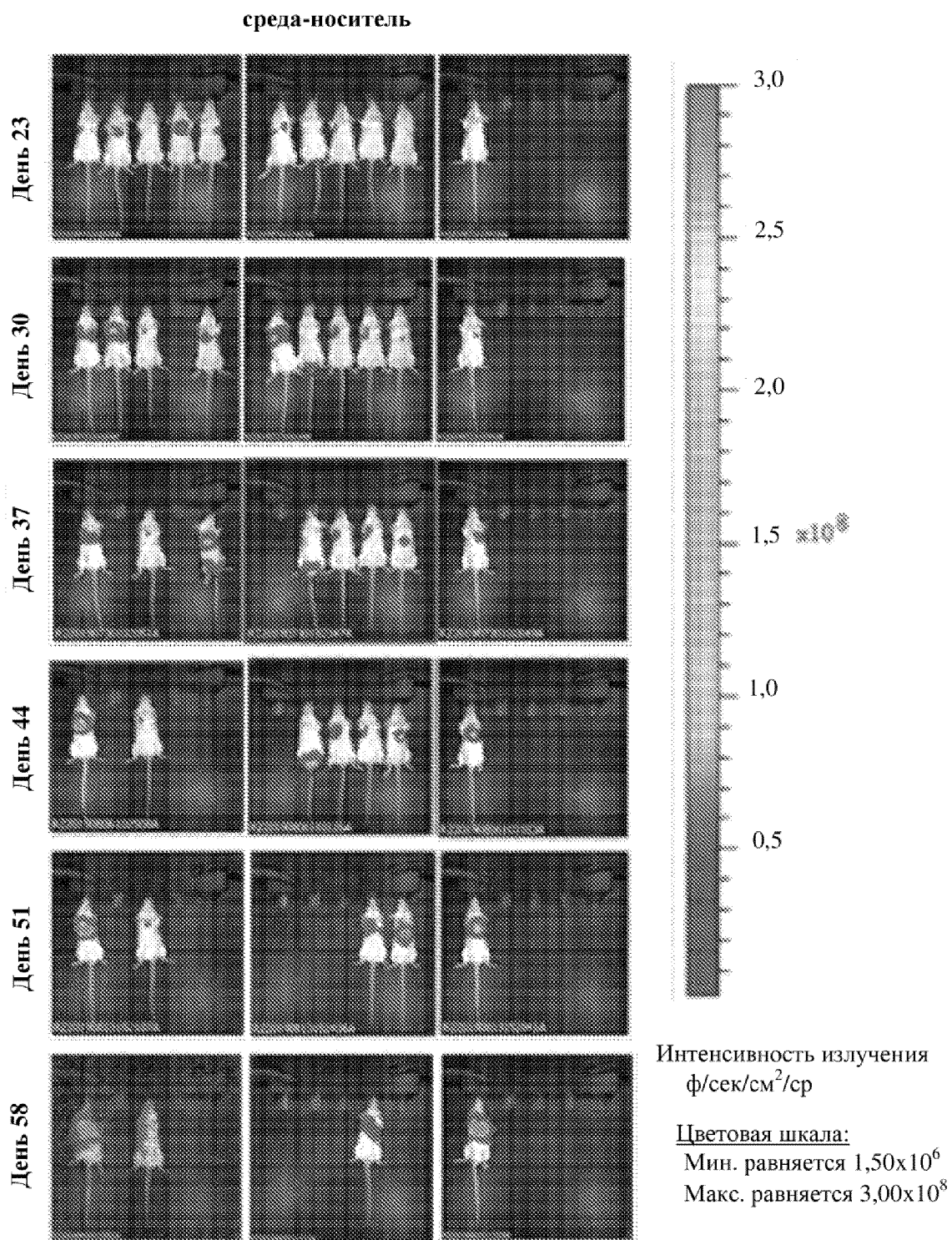
количество DMPG составляет 27,1-29,9 мас. %.

По доверенности

ФИГ. 1

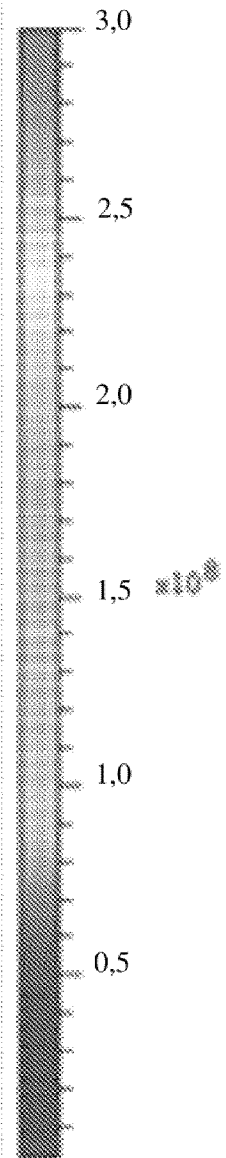
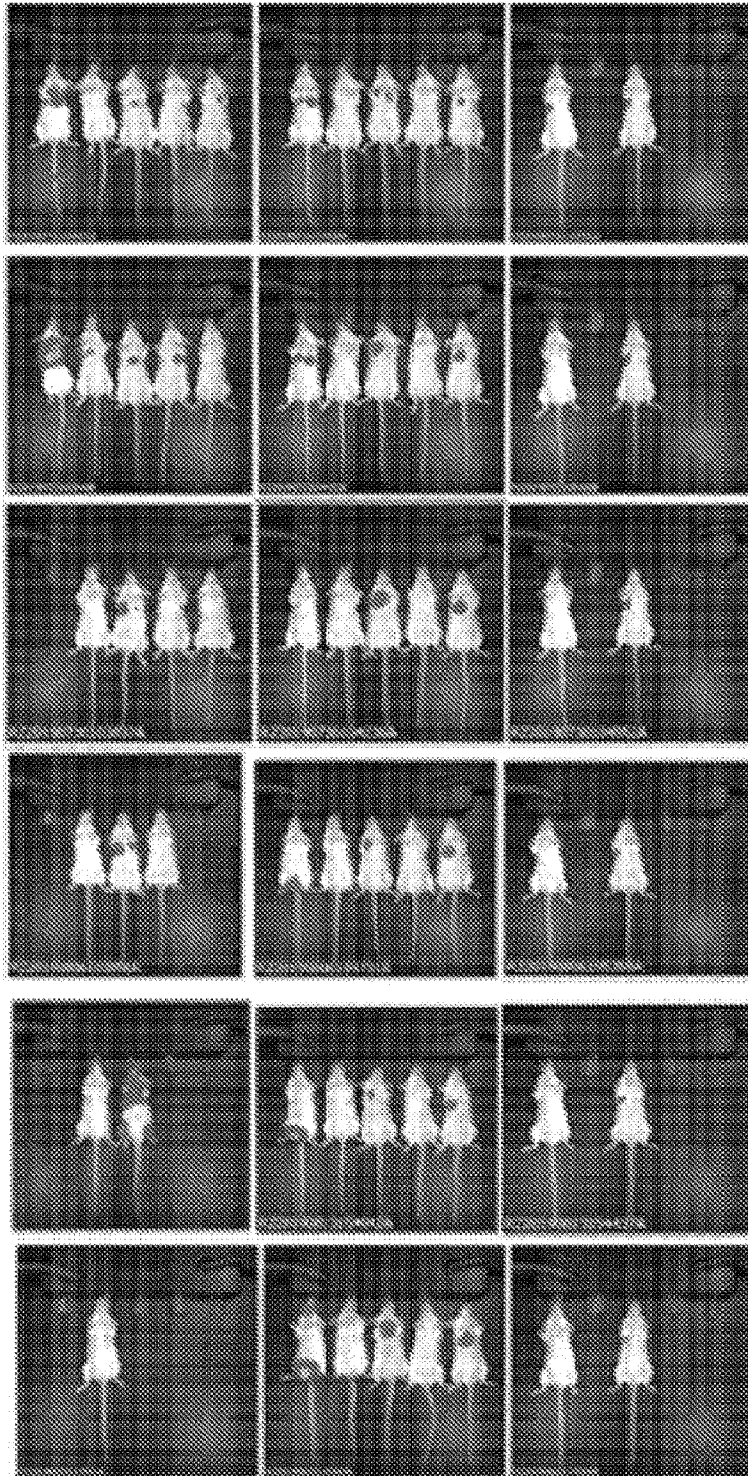


ФИГ. 2



ФИГ. 3

2 мг/кг



Интенсивность излучения  
ф/сек/см<sup>2</sup>/ср

Цветовая шкала:

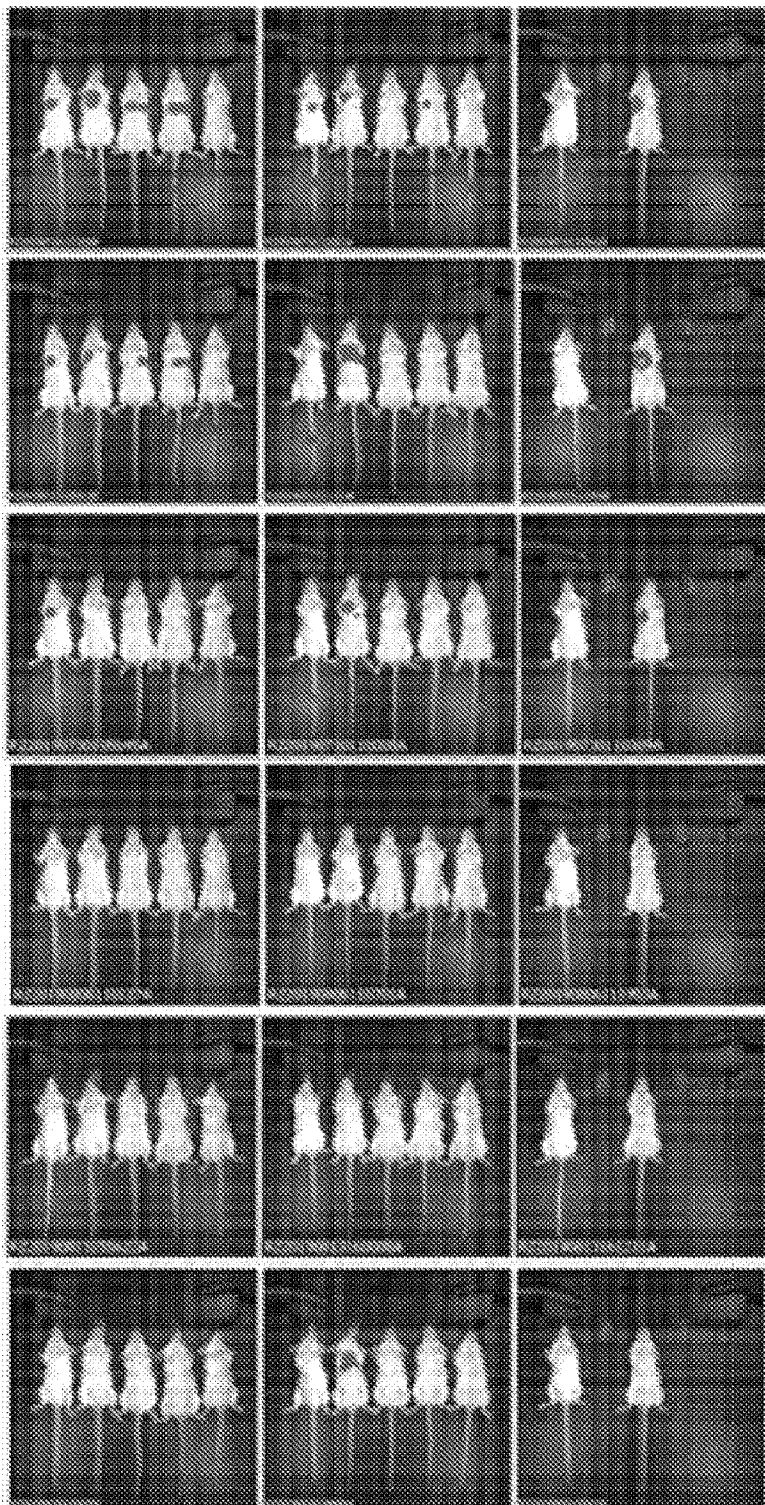
Мин. равняется  $1,50 \times 10^6$

Макс. равняется  $3,00 \times 10^8$

4/10

ФИГ. 4

4 мг/кг

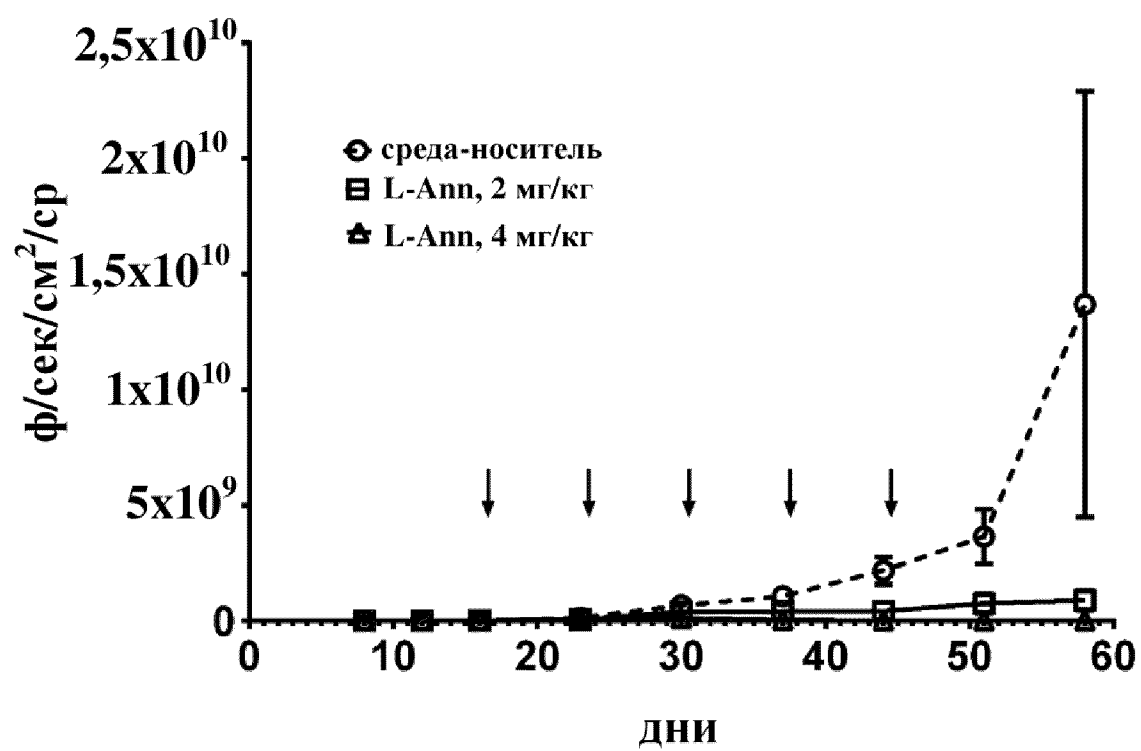


Интенсивность излучения  
ф/сек/см<sup>2</sup>/ср

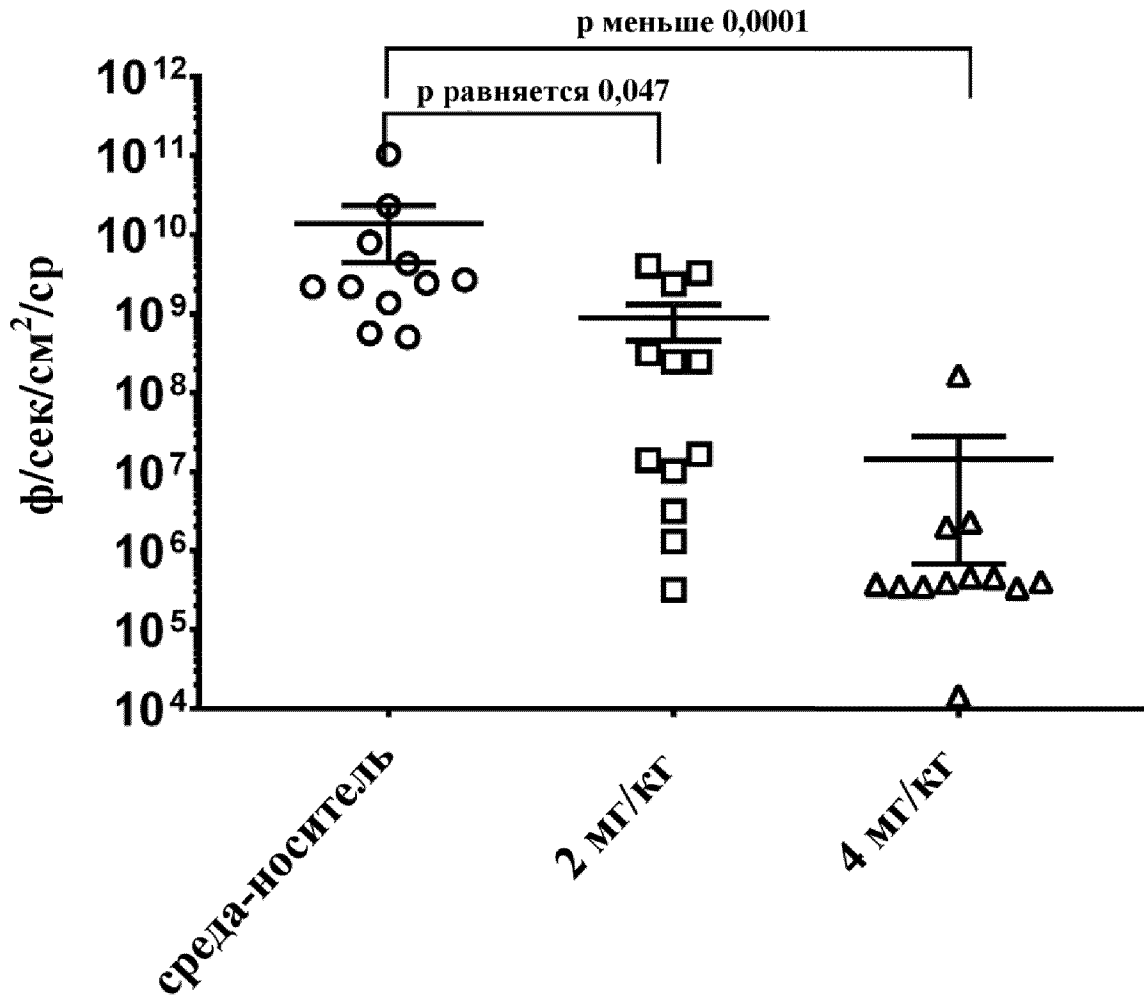
Цветовая шкала:

Мин. равняется  $1,50 \times 10^6$   
Макс. равняется  $3,00 \times 10^8$

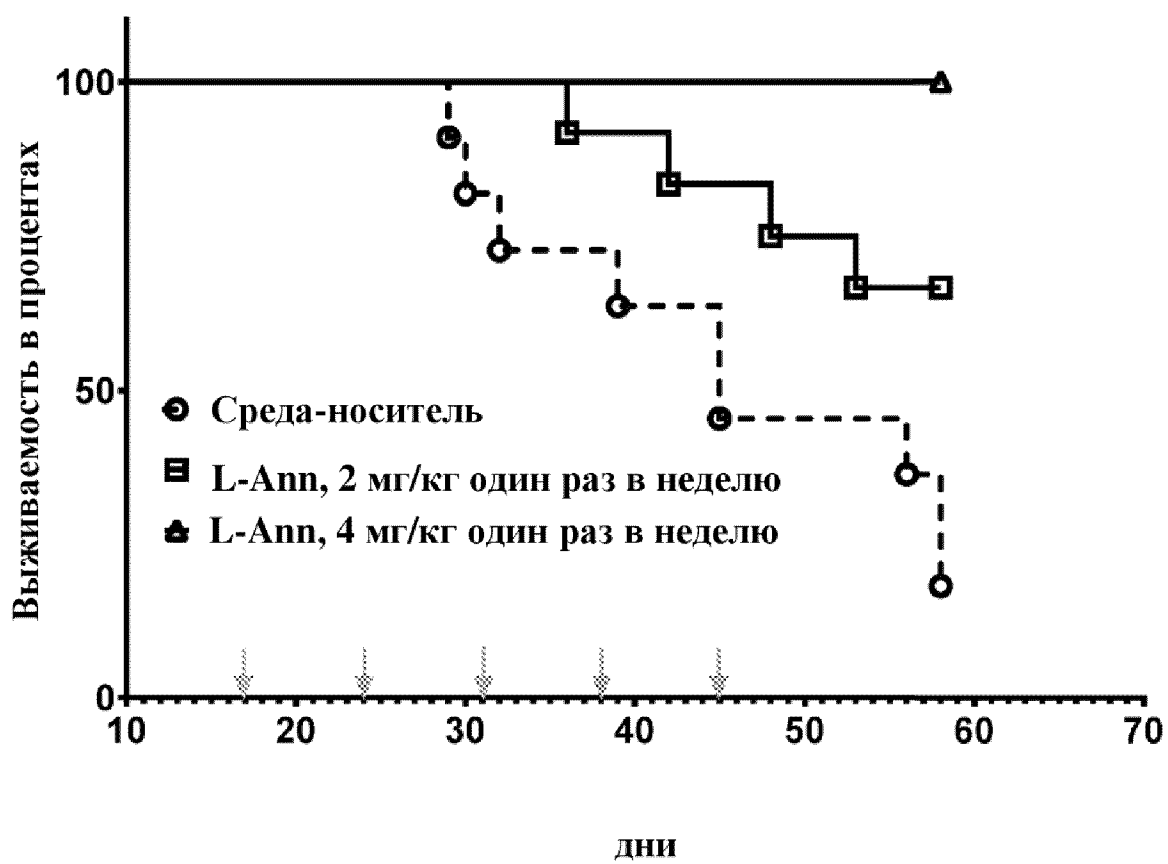
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

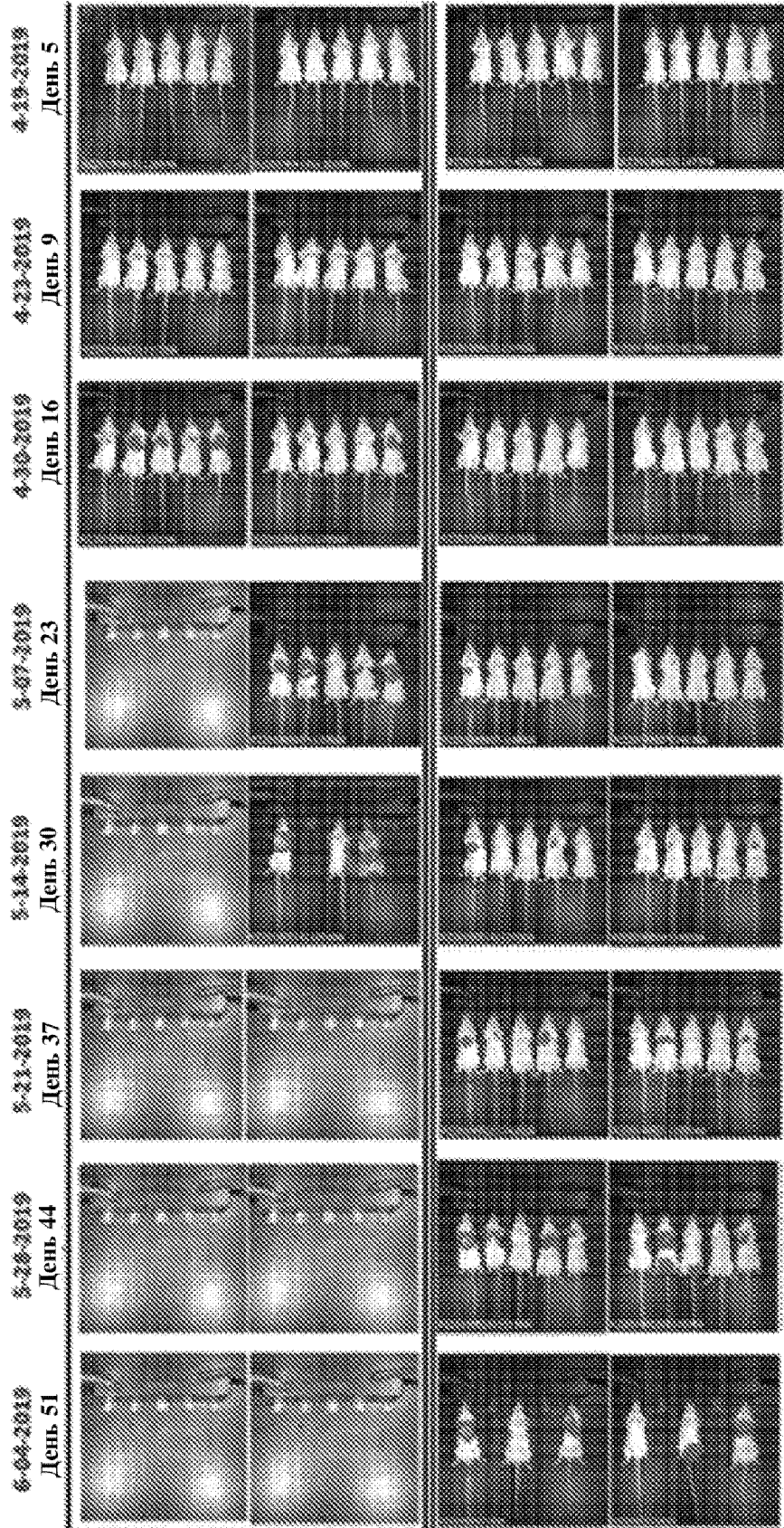




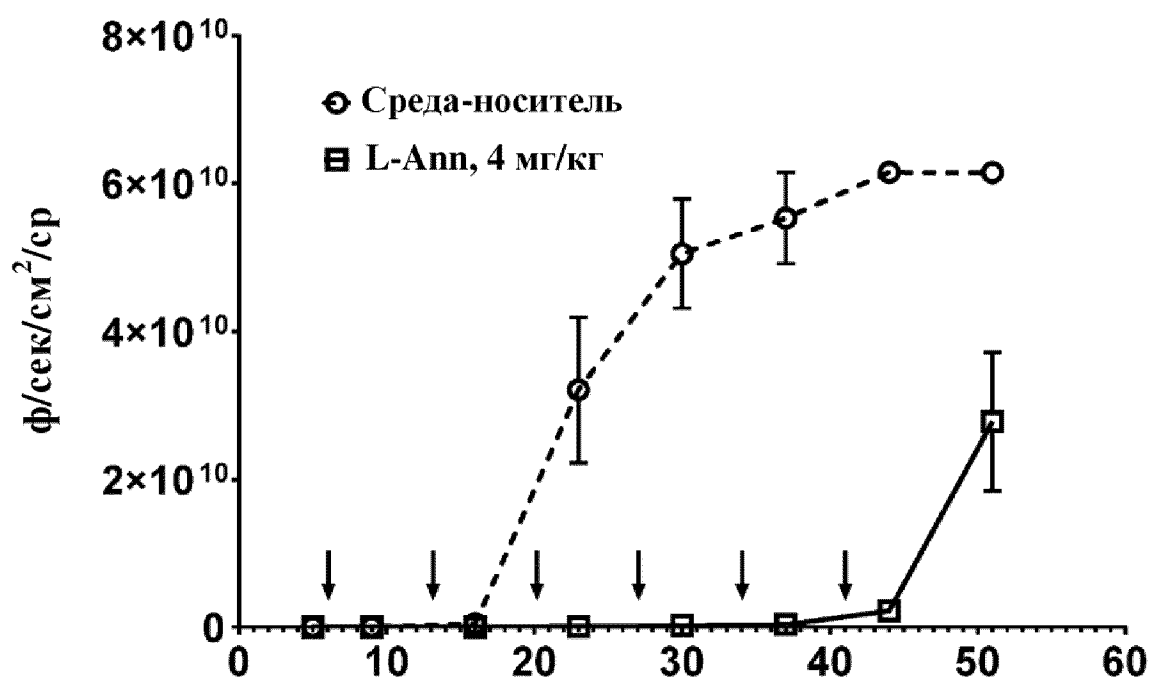
ФИГ. 8

Среда-носитель

L-Anna



ФИГ. 9



ФИГ. 10

