

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291251** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(51) Int. Cl. **C07D 403/14** (2006.01)
C07D 407/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.20

**(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ
ОПУХОЛИ И ПРИМЕНЕНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ БИОМАРКЕРОВ 2-(2,6-
ДИОКСОПИПЕРИДИН-3-ИЛ)-4-((2-ФТОР-4-((3-МОРФОЛИНОАЗЕТИДИН-1-
ИЛ)МЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АМИНО)ИЗОИНДОЛИН-1,3-ДИОНА**

(31) **62/924,044**

(32) **2019.10.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/056431**

(87) **WO 2021/080950 2021.04.29**

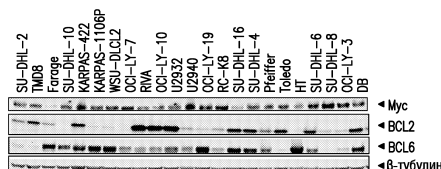
(71) Заявитель:
СЕЛДЖЕН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

**Антон Мария Сорайя Каррансио,
Фонтанилло Селиа Фонтанилло,
Касибхатла Шайладжа, Лопез-Гирона
Антониа, Лу Ганг, Ванг Кай (US)**

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

(57) Способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, предусматривающий введение соединения для лечения субъекту, страдающему гематологической злокачественной опухолью, взятие образца у субъекта, определение уровня биомаркера в образце, взятом у субъекта, и диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце изменяется по сравнению с контрольным уровнем биомаркера, где соединение для лечения представляет собой соединение 1, соединение 2 или соединение 3.



A1

202291251

202291251

A1

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И ПРИМЕНЕНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ БИОМАРКЕРОВ 2-(2,6- ДИОКСОПИПЕРИДИН-3-ИЛ)-4-((2-ФТОР-4- ((3-МОРФОЛИНОАЗЕТИДИН-1- ИЛ)МЕТИЛ)БЕНЗИЛ)АМИНО)ИЗОИНДОЛИН-1,3-ДИОНА

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/924044, поданной 21 октября 2019, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

1. Область техники настоящего изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к способам идентификации и диагностики пациентов, страдающих гематологической злокачественной опухолью, такой как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) или хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (CLL/SLL). В частности, настоящее изобретение относится к способам определения уровня экспрессии определенных биомаркеров для идентификации пациентов, у которых гематологическая злокачественная опухоль, такая как DLBCL или CLL/SLL, вероятно будет отвечать на лечение соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Настоящее изобретение также относится к способам лечения таких пациентов соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, которые предусматривают вышеуказанную методологию. Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам для осуществления способов, раскрытых в настоящем документе.

2. Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0002] Рак характеризуется прежде всего увеличением количества аномальных клеток, происходящих из данной нормальной ткани, инвазией этих аномальных клеток в соседние ткани или лимфатическим или опосредованным кровью распространением злокачественных клеток в региональные лимфатические узлы и метастазированием. Клинические данные и молекулярно-биологические исследования показывают, что рак представляет собой многостадийный процесс, который начинается с незначительных

предраковых изменений, которые при определенных условиях могут прогрессировать до неоплазии. Неопластическое поражение может развиваться клонально и приобретать возрастающую способность к инвазии, росту, метастазированию и гетерогенности, особенно в условиях, при которых неопластические клетки ускользают от иммунного надзора хозяина. Существующее в настоящее время лечение рака может предусматривать хирургическое вмешательство, химиотерапию, гормональную терапию и/или лучевую терапию для уничтожения опухолевых клеток у пациента. Последние достижения в лечении рака раскрыты в Rajkumar *et al.* in *Nature Reviews Clinical Oncology* 11, 628–630 (2014).

[0003] NHL является пятым среди наиболее распространенных видов рака как у мужчин, так и у женщин в Соединенных Штатах Америки. По оценкам, в 2012 г. у 385 700 пациентов во всем мире диагностировали NHL. 199700 пациентов умерли в результате заболевания. (Torre, L.A. *et al.* Global cancer statistics, 2012, *CA Cancer J. Clin.* 65, 87-108 (2015)). Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) составляет приблизительно одну треть случаев неходжкинской лимфомы (NHL) и является наиболее распространенной формой В-клеточной NHL, в 2016 г. в США было зарегистрировано 27650 новых случаев DLBCL, что составляет приблизительно 26% всех диагностированных зрелых В-клеточных новообразований NHL (Teras, L. R. *et al.* 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes, *CA Cancer J. Clin.* 66, 443-459 (2016)). В то время как некоторые пациенты с DLBCL излечиваются с помощью традиционной химиотерапии, остальные умирают в результате заболевания.

[0004] Основным препятствием для лечения DLBCL с помощью существующих в настоящее время способов лечения является способность определенных лимфом приобретать резистентность или становиться невосприимчивыми к стандартной терапии первой линии R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизолон) или более новым средствам, таким как венетоклакс и ибрутиниб. Приблизительно у 30-40% пациентов развивается рецидивирующее/невосприимчивое заболевание, что остается основной причиной заболеваемости и смертности из-за ограниченных терапевтических возможностей (Camicia *et al.* *Mol. Cancer* 14, 207 (2015)). В результате пациенты с рецидивирующей/невосприимчивой DLBCL имеют плохой прогноз.

[0005] Недавние достижения в профилировании экспрессии генов привели к идентификации по меньшей мере трех различных молекулярных подтипов DLBCL: подтип В-клеток зародышевого центра, активированный В-клеточный подтип и первичный медиастинальный подтип В-клеточной лимфомы. ABC-DLBCL подтип связан с очень плохим прогнозом при лечении с применением только CHOP, большинство пациентов с

ABC-DLBCL, получающие только CHOP, умирают в результате их заболевания. Показатель 3-х летней выживаемости без прогрессирования (PFS) и показатель общей выживаемости (OS) для пациентов с ABC-DLBCL, получавших лечение R-CHOP, составляют приблизительно 40 % и 45 %, соответственно, в то время как соответствующие показатели PFS и OS у пациентов с GCB-DLBCL, получавших R-CHOP, составляет приблизительно 74% и 80%, соответственно. Эти группы пациентов имеют особую неотложную клиническую потребность из-за очень агрессивного клинического течения, высокой химиорезистентности и низкой общей выживаемости при лечении с R-CHOP.

[0006] Кроме того, прогрессирование заболевания у пациентов с лимфомой было связано с ослаблением функции иммунной системы. Например, Т-клеточное истощение наблюдали у пациентов с В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL) (Yang, 2014, Yang, 2015). Истощенные Т-клетки показывают снижение дифференцировки, пролиферации и функции продукции цитокинов. Поэтому, улучшение функции иммунной системы, активация иммунной системы могут способствовать лечению гематологической злокачественной опухоли, такой как DLBCL.

[0007] Цитотоксическое химиотерапевтическое средство предсказуемым образом подавляет систему кроветворения, нарушая защитные механизмы хозяина, и приводит к серьезной токсичности, связанной с противораковым химиотерапевтическим средством. Степень и продолжительность нейтропении определяют риск инфицирования (Crawford, 2004). В результате доклиническая оценка миелоидной токсичности остается решающей для разработки новых вариантов терапевтических средств для пациентов, страдающих гематологической злокачественной опухолью. Нейтрофилы представляют собой первую линию защиты от инфекции как первый клеточный компонент воспалительной реакции и ключевой компонент врожденного иммунитета. Кроме того, нейтропения притупляет воспалительную реакцию на зарождающиеся инфекции, позволяя бактериям размножаться и инвазировать. Таким образом, оценка нейтропении может способствовать контролю лечения гематологической злокачественной опухоли, такого как схема лечения DLBCL или CLL/SLL.

[0008] Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) представляет собой лимфопролиферативное злокачественное новообразование, характеризующееся прогрессирующим накоплением морфологически зрелых, но функционально некомпетентных В-лимфоцитов в крови, костном мозге и лимфоидных тканях с уникальным кластером дифференцировки (CD) в фенотип CD19+, CD5+ и CD23+. Это наиболее распространенный лейкоз в Северной Америке и Европе с заболеваемостью 4,0 случая на 100000 человек в год, который поражает в основном пожилых пациентов со

средним возрастом при поступлении 72 года. Клиническое течение CLL варьирует от вялотекущего заболевания с долгосрочной выживаемостью более 12 лет до агрессивного заболевания с медианой выживаемости 2 года и зависит от стадии при появлении и определенных специфических для заболевания характеристик, таких как цитогенетические аномалии. В настоящее время клиническое течение и прогноз отражают развивающийся терапевтический подход, включая появление новых средств, которые становятся доступными для лечения CLL. Несмотря на недавнее введение нескольких высокоэффективных средств, CLL остается неизлечимым заболеванием для пациентов, которым не проводится аллогенная трансплантация стволовых клеток и, следовательно, требует разработки альтернативных и дополнительных вариантов лечения.

[0009] Молекулярный патогенез CLL/SLL представляет собой сложный многогранный процесс, характеризующийся конкретными генетическими aberrациями, и показывает конвергенцию изменений клеточных сигнальных путей, включая рецептор В-клеток и пути апоптоза, а также влияние опухоль-иммунного микроокружения. Термин CLL используют, когда заболевание проявляется прежде всего в крови, тогда как термин малая лимфоцитарная лимфома (SLL) используют при вовлечении в основном лимфатических узлов. В частности, SLL, как это определено на Международном семинаре по критериях хронического лимфоцитарного лейкоза (iwCLL), представляет собой заболевание у пациентов, у которых в противном случае был бы диагностирован CLL, но у которых наблюдается относительно нормальное количество периферических лимфоцитов, и которое требует наличия лимфаденопатии и/или спленомегалии. В отличие от CLL, который часто обнаруживается в крови и костном мозге, а также в других очагах заболевания, таких как лимфатические узлы, селезенка и внеузловые локализации, у пациентов с SLL менее выражены проявления в периферической крови.

[0010] Как свидетельствует недавнее одобрение регулируемыми органами нескольких новых нацеленных средств, таких как ибрутиниб и венетоклакс, подход к лечению CLL развивается. Однако, несмотря на доступность этих новых средств, пациенты продолжают сталкиваться с рецидивом или невосприимчивостью к лечению. Более того, пациенты с цитогенетическими характеристиками высокого риска по-прежнему имеют более плохие результаты по сравнению с пациентами без этих характеристик. Улучшенные и новые комбинированные терапии для CLL остаются важной медицинской потребностью. Кроме того, более широкое использование таргетных терапий привело к появлению новых мутаций, которые, как было показано, вызывают резистентность к терапии. Например, резистентность к ингибитору ВТК ибрутинибу, как обнаружено, связана с мутациями либо в сайте связывания ВТК, либо с мутациями, которые приводят к автономной активности В-

клеточных рецепторов. Поэтому исследование средств с новыми механизмами является важным для того, чтобы предложить варианты лечения с уникальным механизмом действия (МОА) для пациентов, у которых может развиваться резистентность к новым нацеленным средствам.

[0011] Сохраняется значительная потребность в безопасных и эффективных способах лечения, профилактики и контроля гематологической злокачественной опухоли, такой как DLBCL или CLL/SLL, особенно DLBCL или CLL/SLL, которые невосприимчивы к стандартным способам лечения, при одновременном снижении или устранении токсичности и/или побочных эффектов, связанных с традиционной терапией. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и обеспечивает связанные преимущества.

[0012] Цитирование или идентификация любой ссылки в данном разделе настоящей заявки не обязательно должно быть истолковано как допущение, что ссылка является частью предшествующего уровня техники настоящего изобретения.

3. Краткое раскрытие настоящего изобретения

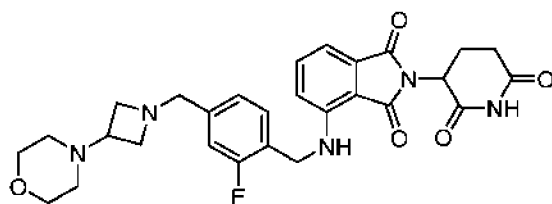
[0013] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающему:

- (a) взятие образца у субъекта,
- (b) определение уровня биомаркера в образце,
- (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения,

если:

- (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или
- (ii) уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, и

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0014] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу селективного лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, предусматривающему:

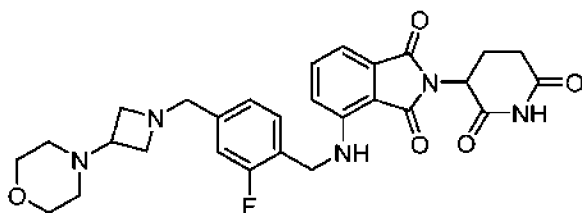
- (a) взятие образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью,
- (b) определение уровня биомаркера в образце,
- (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения,

если:

- (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или
- (ii) уровень биомаркера представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, и

- (d) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, диагностированному как вероятно отвечающий на соединение для лечения,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0015] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер представляет собой цереблон (CRBN), и способ предусматривает диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если CRBN является обнаруживаемым или выше контрольного уровня в образце.

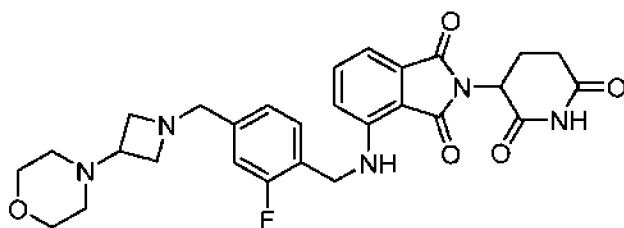
[0016] Согласно другим вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер представляет собой Ikaros, Aiolos, ZFP91 или их комбинацию, и способ предусматривает диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце ниже контрольного уровня. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой комбинацию Ikaros и Aiolos, и способ предусматривает

диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень как Ikaos, так и Aiolos ниже их соответствующих контрольных уровней.

[0017] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающему:

- (a) взятие образца у субъекта,
- (b) введение соединения для лечения в образец,
- (c) определение уровня биомаркера в образце и
- (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для

лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



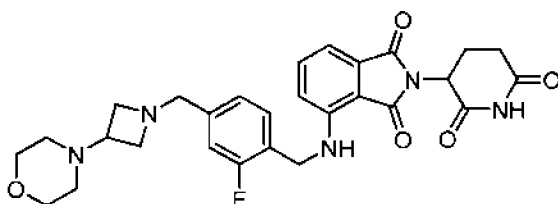
(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0018] Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающему:

- (a) введение соединения для лечения субъекту,
- (b) взятие образца у субъекта,
- (c) определение уровня биомаркера в образце и
- (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для

лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



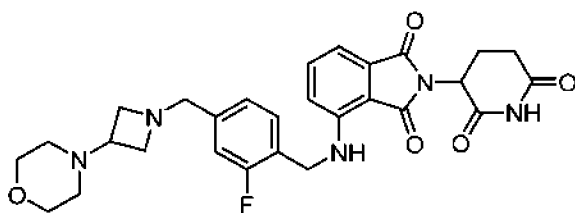
(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0019] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу контроля эффективности соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, предусматривающему:

- (a) введение соединения для лечения субъекту,
- (b) взятие образца у субъекта,
- (c) определение уровня биомаркера в образце и
- (d) сравнение уровня биомаркера в образце с контрольным уровнем биомаркера, где измененный уровень биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



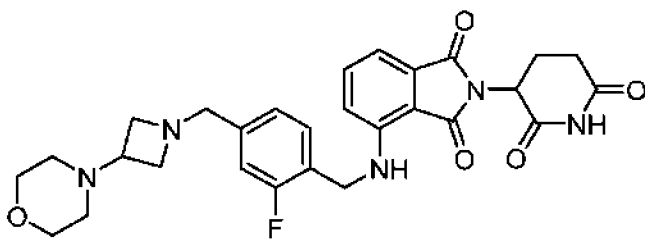
(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0020] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, соединением для лечения, предусматривающему:

- (a) введение дозы соединения для лечения субъекту,
- (b) взятие одного или нескольких образцов у субъекта в различные моменты времени и
- (c) контроль уровня биомаркера в одном или нескольких образцах и
- (d) установление дозы для последующего введения соединения для лечения на основе измененного уровня биомаркера в контрольном образце,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0021] Согласно некоторым вариантам осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, дополнительно предусматривают введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, диагностированному как вероятно отвечающий на соединение для лечения.

[0022] Согласно определенным вариантам осуществления измененный уровень биомаркера в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления измененный уровень биомаркера в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0023] Согласно некоторым вариантам осуществления повышенный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта. Согласно другим вариантам осуществления пониженный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта.

[0024] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у субъекта перед введением соединения для лечения субъекту, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец. Согласно другим вариантам осуществления контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у здорового субъекта, не страдающего гематологической злокачественной опухолью, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец. Согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень биомаркера представляет собой заранее определенный уровень биомаркера.

[0025] Согласно определенным вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер содержит маркер апоптоза, и изменение уровня биомаркера является показателем индукции апоптоза. Согласно конкретным вариантам

осуществления биомаркер выбирают из расщепляющей каспазы 3, расщепляющей каспазы 7, расщепленной поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), BCL2, сурвивина, фосфатидилсерина (PS) и ДНК, Bcl-2-подобного белка 11 (BIM), фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина-10 (IL-10) или интерлейкина-27 (IL27) или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер, который включает маркер апоптоза, выбирают из группы, состоящей из Аннексин-V, 7-амино-актиномицина D (7-AAD) и ярко-красного антрахинона 7 (DRAQ7) или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0026] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер выбирают из IL-8, IL-1a, sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, коллаген-I и -III, PAI-1, CD69 или sIL-10, или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0027] Согласно определенным вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер связан с передачей сигнала интерферона. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с передачей сигнала интерферона, включает сигнальный трансдуктор интерлейкина-6 (IL6ST), интерферон-индуцируемый трансмембранный белок 3 (IFITM3), интерферон-альфа-индуцируемый белок 6 (IFI6), 2'-5'-олигоаденилатсинтазу 3 (OAS3), интерферон α (IFN α), интерферон β (IFN β) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0028] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер связан с передачей сигнала цитокина/хемокина. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с передачей сигнала цитокина/хемокина, включает субъединицу альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 1 (CCL1) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0029] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер связан с клеточной адгезией. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с клеточной адгезией, включает E-селектин (SELE), гликопротеиновый лиганд

Р-селектина 1 (SELPLG), тромбоксан A2 (TXA2) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0030] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер связан с межклеточным соединением. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с межклеточным соединением, включает клаудин 7 (CLDN7), клаудин 12 (CLDN12) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0031] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер представляет собой сопряженный с G-белком рецептор. Согласно конкретным вариантам осуществления сопряженный с G-белком рецептор включает рецептор свободной жирной кислоты 2 (FFAR2). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0032] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер связан с внеклеточным матриксом. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с внеклеточным матриксом, содержит CD209, SERPINA, SERPINB7 или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0033] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер связан с клеточным циклом. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0034] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер связан с транскрипцией. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0035] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер включает один или несколько белков, выбранных из группы, состоящей из Aiolos (IKZF3), Ikaros (IKZF1), E3 убиквитинпротеинлигазы ZFP91 (ZFP91), белка C-ets-1 (ETS1), Мах-связывающего белка MNT (MNT), миоцит-

специфического энхансерного фактора 2В (MEF2B), субъединицы 1 snRNA-активирующего белкового комплекса (SNAPC1), лизин-специфической деметилазы 4В (KDM4B), фактора транскрипции AP-4 (TFAP4), ядерного фактора транскрипции 1 (UBTF), белка 1, содержащего смежный гомологичный бромодомен (BAND1), белка 4, содержащего метил-СpG-связывающий домен 4 (MBD4), гомолога белка хромобокса 2 (CBX2), опухолевого белка 63 (TP63), трансдуцин-подобного белка энхансера 3 (TLE3), белка forkhead box P1 (FOXP1), белка 11, содержащего цинковый палец и домен ВТВ (ZBTB11), регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), медиатора субъединицы транскрипции РНК-полимеразы II 26 (MED26), циклический АМР-зависимого фактора транскрипции ATF-7 (ATF7), белка 644 цинкового пальца (ZNF644), лизин-специфической деметилазы 5В (KDM5B), вышестоящего стимулирующего фактора 2 (USF2), фактора транскрипции 25 (TCF25), лизин-специфической деметилазы 4А (KDM4A), летального (3) белка 2, подобного злокачественной опухоли головного мозга (L3MBTL2), субъединицы 4 яРНК-активирующего белкового комплекса (SNAPC4), лизин-специфической деметилазы 5 (KDM5), фактора транскрипции COE1 (EBF1), белка forkhead box J2 (FOXJ2), ядерного фактора активированных Т-клеток, цитоплазматического 1 (NFATC1), белка-активатора распада мРНК ZFP36 (ZFP36), происходящего из гепатомы фактора роста (HDGF), ETS-связанного фактора транскрипции Elf-1 (ELF1), белка промиелоцитарного лейкоза (PML), Myb-связанного белка В MYBL2, матери против декапентегического гомолога 2 (SMAD2), хромодомен-ДНК-хеликаза-связывающего белка 2 (CHD2), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1), белка paired box Pax-5 (PAX5), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 2 (STAT2), гомолога pyporus 2 (PYGO2), регуляторного фактора интерферона 9 (IRF9), белка 2 кольцевого пальца группы polycomb (PCGF2) и циклический АМР-зависимого фактора транскрипции ATF-3 (ATF3). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0036] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер включает один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из субъединицы альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокинового (С-С мотив) лиганда 2 (CCL2) и SLIT-ROBO Rho GTPаза-активирующего белка 1 (SRGAP1). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0037] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер содержит

CRBN-ассоциированный белок или мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка. Согласно конкретным вариантам осуществления CRBN-ассоциированный белок включает IKAROS, AIOLOS или ZFP91. Согласно другим конкретным вариантам осуществления мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка включает BCL6, c-MYC или IRF4. Согласно другим вариантам осуществления мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка включает интерферон-индуцируемый ген. Согласно конкретным вариантам осуществления интерферон-индуцируемый ген включает регуляторный фактор интерферона 7 (IRF7), интерферон-индуцированный белок с тетрапептидными повторами 3 (IFIT3), белок DEAD box 58 (DDX58) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0038] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер выбирают из группы, состоящей из ингибитора циклинзависимой киназы 1 (p21). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0039] Согласно определенным вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер включает маркер Т-клеточной активации. Согласно конкретным вариантам осуществления маркер Т-клеточной активации включает цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией. Согласно некоторым вариантам осуществления цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией, включает интерлейкин 2 (IL-2). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0040] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер содержит PD1 и LAG3. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

[0041] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, биомаркер включает эффекторный цитокин или эффекторный хемокин. Согласно конкретным вариантам осуществления эффекторный цитокин или эффекторный хемокин включают гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерферон-гамма (IFN γ) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше

контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

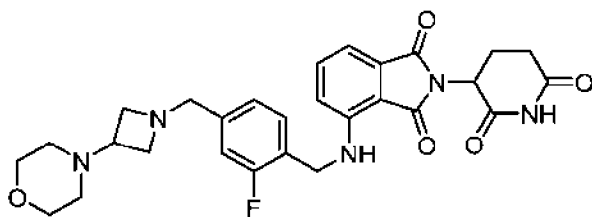
[0042] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер экспрессируется в белом кровяном тельце. Согласно конкретным вариантам осуществления белое кровяное тельце включает лимфоидную клетку. Согласно еще более конкретным вариантам осуществления лимфоидная клетка включает Т-клетку.

[0043] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения гематологической злокачественной опухоли, предусматривающему:

- (a) получение первого образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью,
- (b) определение уровня биомаркера в первом образце,
- (c) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту,
- (d) получение по меньшей мере одного дополнительного образца у субъекта после лечения и
- (e) определение уровня биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце, и

если уровень биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце находится при или около уровня биомаркера первого образца, тогда введение другого терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[0044] Согласно определенным вариантам осуществления способа лечения гематологической злокачественной опухоли, биомаркер содержит Ikaros. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер Ikaros экспрессируется в белом кровяном тельце. Согласно еще более конкретным вариантам осуществления белое кровяное тельце включает миелоидную клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления миелоидная клетка включает нейтрофил. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер

включает нейтрофилы, имеющие фенотип CD11b⁺, CD34⁺ и CD33⁺.

[0045] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, соединение формулы (I) включает (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, соединение формулы (I) включает (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, соединение формулы (I) включает смесь (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона и (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона или их таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

[0046] Согласно другим вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, способ дополнительно предусматривает введение терапевтически эффективного количества второго активного агента или поддерживающей терапии. Согласно определенным вариантам осуществления второй активный агент включает ингибитор HDAC (например, панобиностат, ромидеписин, вориностат или цитариностат), ингибитор BCL2 (например, венетоклакс), ингибитор ВТК (например, ибрутиниб или акалабрутиниб), ингибитор mTOR (например, эверолимус), ингибитор PI3K (например, иделалисиб), ингибитор PKC β (например, энзастаурин), ингибитор SYK (например, фостаматиниб), ингибитор JAK2 γ (например, федраитниб, пакритиниб, руксолитиниб, барицитиниб, гандотиниб, лестауртиниб или момелотиниб), ингибитор киназы Aurora A (например, алисертиб), ингибитор EZH2 (например, таземетостат, GSK126, CPI-1205, 3-деазанепланоцин А, EPZ005687, EI1, UNC1999 или синефунгин), ингибитор BET (например, бирабресиби или 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он), гипометилирующий агент (например, 5-азациитидин или децитабин), химиотерапевтическое средство (например, бендамустин, доксорубицин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, ифосфамид, мелфалан, оксалиплатин или дексаметазон), анти-CD20 моноклональное антитело (например, ритуксимаб или обинутузумаб) или эпигенетическое соединение или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления второй активный агент содержит ритуксимаб. Согласно определенным вариантам осуществления второй активный агент содержит обинутузумаб.

[0047] Согласно определенным вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, гематологическая злокачественная опухоль поражает гематopoэтические или лимфоидные ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль включает неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома включает диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Согласно еще более конкретным вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная опухоль включает хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL). Согласно определенным вариантам осуществления CLL/SLL представляет собой рецидивирующий или невосприимчивый CLL/SLL.

[0048] Согласно определенным вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, образец включает гематологическую злокачественную опухолевую клетку.

[0049] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня белка биомаркера.

[0050] Согласно некоторым вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня мРНК биомаркера.

[0051] Согласно определенным вариантам осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня кДНК биомаркера.

4. Краткое описание чертежей

[0052] На **фиг. 1А – фиг. 1С** проиллюстрировано, что клеточные линии DLBCL экспрессируют связанные с DLBCL белки Мус, BCL2 и BCL6 (фиг. 1А), а также убиквитинлигазу E3 CRL4^{CRBN} и ее субстраты Aiolos, Ikaros и ZFP91 (фиг. 1В). Количественную оценку уровней экспрессии CRBN нормализовали к уровням CRBN в клетках DF15 (фиг. 1С). Бета-тубулин использовали в качестве контроля загрузки.

[0053] На **фиг. 2** проиллюстрировано, что Соединение 1 было активным в клеточных линиях DLBCL с приобретенной резистентностью к доксорубину. Жизнеспособность родительских (квадрат) и связанных с ними клеточных линий Дохо-Р (круг) в клеточных линиях ABC (верхняя панель) и GCB (нижняя панель), а также кривые индукции апоптоза

получали после воздействия серийно разведенного Соединения 1 в течение 5 дней.

[0054] На **фиг. 3** проиллюстрированы репрезентативные иммуноблоты, показывающие профили экспрессии цереблona и соответствующих субстратов цереблona Aiolos, Ikaros и ZFP91 и белков c-Мус, IRF4, BCL2, MCL1 и BCL6 в клеточных линиях приобретенной резистентности к доксорубину и в соответствующих подходящих родительских клетках.

[0055] На **фиг. 4A** и **фиг. 4B** проиллюстрировано, что Соединение 1 было селективным антипролиферативным в (**фиг. 4A**) эндотелиальных клетках, Т- и В-лимфоцитах и (**фиг. 4B**) коронарных гладкомышечных клетках и фибробластах. Панель BioMAP Diversity PLUS оценивали после обработки Соединением 1. На оси X приведены количественные показания биомаркеров на основе белков, измеренные в каждой системе. Ось Y представляет собой логарифмически преобразованное отношение показаний биомаркера для образца, обработанного лекарственным средством ($n = 1$), по сравнению с контролями-носителем ($n \geq 6$). Серая область вокруг оси Y представляет собой диапазон значимости 95%, полученный на основе известных данных для контролей-носителя. Активность биомаркеров аннотировали, когда 2 или более последовательных концентраций изменяются в одном и том же направлении по сравнению с контролями-носителем, выходят за пределы диапазона значимости и имеют по меньшей мере одну концентрацию с размером эффекта $> 20\%$ (соотношение $\log_{10} > 0,1$). Антипролиферативные эффекты обозначены толстой серой стрелкой.

[0056] На **фиг. 5A-фиг. 5D** проиллюстрировано, что активность Соединение 1 зависит от экспрессии CRBN. На **фиг. 5A** показано, что экспрессия белков Aiolos, Ikaros, ZFP91, IRF4 и c-Мус была снижена, а апоптотические белки (расщепляющая каспаза 7, расщепляющая каспаза 3 и расщепленная PARP), а также стимулируемый интерфероном ген IFIT3 индуцировались зависимым от времени и концентрации образом в клетках SU-DHL2, экспрессирующих CRBN, на **фиг. 5B** показано количественное определение сниженных уровней Aiolos, Ikaros и ZFP91, а также повышенных уровней расщепляющей каспазы 3, расщепляющей каспазы 7 и расщепленной поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), которые сначала нормализовали к β -тубулину, а затем дополнительно нормализовали к уровням каждого белка в момент времени 0 часов после обработки DMSO (круг), 0,001 нМ (квадрат), 0,01 нМ (треугольник вверх) или 0,1 нМ (треугольник вниз) Соединения 1, на **фиг. 5C** показано, что в клетках с нокаутом SU-DHL CRBN эффект не наблюдался, на **фиг. 5D** показано, что апоптоз увеличивался с течением времени с использованием флуоресцентного реагента каспазы-3 в клетках SU-DHL2^{CRBNWT} (верхняя панель) после обработки 0,01 нМ (круг), 0,1 нМ (квадрат), 1,0 нМ (треугольник вверх), 10

нМ (треугольник вниз), 100 нМ (ромб) или 1000 нМ (светлый кружок) Соединения 1, но не в клетках SU-DHL2^{CRBN^{-/-}} (нижняя панель). WT= дикий тип.

[0057] На **фиг. 6А-фиг. 6D** проиллюстрировано, что Соединение 1 снижало экспрессию белков-субстратов CRBN и индуцировало экспрессию апоптотических и интерферон-стимулируемых генов в клеточных линиях DLBCL. На Фиг. 6А и 6С показано, что экспрессия белков Aiolos, Ikaros, ZFP91, IRF4 и c-Мус была снижена, а апоптотические белки (расщепляющая каспаза 7, расщепляющая каспаза 3 и расщепленная PARP), а также стимулируемые интерфероном гены IRF7, DDX58 и IFIT3 индуцировались зависимым от времени и концентрации образом в клетках TMD8 и Karpas-422, экспрессирующих CRBN, соответственно. На фиг. 6В показано, что сниженная экспрессия Aiolos, Ikaros, ZFP91, BCL6, IRF4, c-Мус, антиапоптотических белков BIM и сурвивина, а также индукция проапоптотических белков (расщепляющая каспаза 7), а также стимулированных интерфероном генов IRF7, DDX58 и IFIT3 наблюдались в клетках TMD8 через 24 часа после обработки Соединением 1. На фиг. 6D показано, что снижение экспрессии Aiolos, Ikaros, ZFP91 и BCL6 через 24 часа (левая панель) с последующей индукцией p21, IRF7, IFIT3, DDX58 через 48 часов (средняя панель), с индукцией проапоптотических белков расщепляющей каспазы 3, расщепляющей каспазы 7 и расщепленной PARP, а также снижением антиапоптотических белков сурвивина и BCL2, а также MYC наблюдали через 72 часа (правая панель) обработки Соединением 1 в клетках Karpas-422.

[0058] На **фиг. 7А** и **фиг. 7В** проиллюстрировано, что приспособленность клеток клеточных линий DLBCL зависела от индивидуальных субстратов цереблona. На фиг. 7А показана схема, иллюстрирующая дизайн анализа клеточной конкуренции на основе проточной цитометрии для оценки относительных изменений в приспособленности клеток после нокаута представляющего интерес гена. На фиг. 7В показана относительная приспособленность клеток sgNT-1 (круг и сплошная линия), sgNT-2 (круг и пунктирная линия), sgNC-1 (ромб и сплошная линия), sgIKZF1-1 (треугольник вверх и сплошная линия), sgIKZF1-2 (треугольник вверх и штриховая линия), sgIKZF3-1 (квадрат и сплошная линия), sgIKZF3-2 (квадрат и пунктирная линия), sgZFP91-1 (треугольник вниз и сплошная линия), sgZFP91-3 (треугольник вниз и пунктирная линия) и sgETF1-1 («X» и сплошная линия) для соотношений RFP⁺/GFP⁺ в клеточных линиях KARPAS-422-Cas9, U-2932-Cas9, RIVA-Cas9, SU-DHL-16-Cas9, HT-Cas9 и SU-DHL-4-Cas9. Клетки нормализовали по соотношению RFP⁺/GFP⁺ клеток sgNT-1 в каждый момент времени. Нокаут ETF1 (sgETF1-1) служит положительным контролем для сильного снижения соотношения RFP⁺/GFP⁺. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения для 3 независимых экспериментов.

[0059] На **фиг. 8А** и **фиг. 8В** проиллюстрировано, что потеря Ikaros, Aiolos и ZFP91 сенсibiliзирует клетки DLBCL к Соединению 1, что измеряется с помощью анализа клеточной конкуренции на основе проточной цитометрии для оценки относительных изменений в приспособленности клеток при нокауте представляющего интерес гена. На **Фиг.8А** показаны клетки KARPAS-422-Cas9, и **фиг.8В** показаны клетки SU-DHL-4-Cas9. DMSO = диметилсульфоксид, GFP = зеленый флуоресцентный белок, RFP = красный флуоресцентный белок. Нокаут гена указан над каждым набором соотношения RFP+/GFP+. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения для 3 независимых экспериментов.

[0060] На **фиг. 9** проиллюстрировано, что обработка клеток DLBCL Соединением 1 сопоставима с генетическим нокаутом субстратов CRBN Ikaros, Aiolos и ZFP91, как измерено посредством иммуноблоттинга. KARPAS-422-Cas9 (вверху слева), U-2932-Cas9 (вверху справа) и SU-DHL-4-Cas9 (внизу слева). DMSO = диметилсульфоксид.

[0061] На **фиг. 10А** и **фиг. 10В** проиллюстрировано, что двойной нокаут Ikaros и Aiolos имел большее ингибирование приспособленности клеток по сравнению с одиночным нокаутом Ikaros или Aiolos в клеточных линиях DLBCL. На **фиг. 10А** показана схема, иллюстрирующая дизайн анализа клеточной конкуренции на основе проточной цитометрии для оценки относительных изменений в приспособленности клеток после нокаута представляющего интерес гена (генов). На **фиг. 10В** показана относительная приспособленность клеток sgNT-1+sgNT-2 (закрашенный кружок), sgIKZF1-1+sgNT-1 (треугольник вверх и сплошная линия), sgIKZF1-1+sgNT-2 (треугольник вверх и пунктирная линия), sgIKZF3 -1+sgNT-1 (сплошной квадрат и сплошная линия), sgIKZF3-1+sgNT-2 (сплошной квадрат и пунктирная линия), sgIKZF1-1+sgIKZF3-1 (пустой кружок со сплошной линией) и sgIKZF1-2+sgIKZF3 -2 (пустой кружок с пунктирной линией), нормализованная к их соответствующему соотношению RFP+/GFP+ в день 0 в клеточных линиях KARPAS-422-Cas9, U-2932-Cas9, RIVA-Cas9, SU-DHL-16-Cas9, HT-Cas9 и SU-DHL-4-Cas9. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего значения 3 для независимых экспериментов.

[0062] На **фиг. 11** проиллюстрировано, что эктопическая экспрессия устойчивых к разрушению мутантов Ikaros (IKZF1-G151A) (треугольник вверх), Aiolos (IKZF3-G152A) (квадрат) и ZFP91 (ZFP91-G405A) (треугольник вниз) обеспечивала защиту от Соединения 1 в клеточных линиях KARPAS-422, RIVA, HT и SU-DHL-4, как измерено с помощью люциферазы.

[0063] На **фиг. 12** проиллюстрировано, что Соединение 1 индуцирует разрушение Ikaros в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) четырех здоровых

доноров (HD1-4). Процент Ikaros-позитивных клеток нормализовали по отношению к контролю DMSO, после непрерывного воздействия Соединением 1 в течение 3, 4 или 7 дней у четырех доноров. Ikaros измеряли с помощью проточной цитометрии. Данные представляют собой средний процент клеток, положительных по Ikaros. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). N = 4 донора с тремя повторениями.

[0064] На **фиг. 13** показано, что Соединение 1 увеличивало абсолютные уровни секреции интерлейкина-2 (IL2) после того, как PBMC здоровых доноров подвергали воздействию Соединением 1 в течение 3 (круг), 4 (квадрат) и 7 (треугольник) дней. Супернатант разбавляли 1:10 и секрецию IL-2 измеряли с помощью методики MSD. Точки данных представляют собой среднее значение n = 3 повторов. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). DMSO = диметилсульфоксид, HD = здоровый донор, IL-2 = интерлейкин-2, мл = миллилитр, нМ = наномолярный, пг = пикограмм.

[0065] На **фиг. 14** показано, что Соединение 1 повышало кратное изменение секреции интерлейкина-2 (IL2) после того, как PBMC здоровых доноров подвергали воздействию Соединением 1 в течение 3 (круг), 4 (квадрат) и 7 (треугольник) дней относительно DMSO. Супернатант разбавляли 1:10 и секрецию IL-2 измеряли с помощью технологии MSD. Точки данных представляют собой среднее значение n = 3 повторов. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего (SEM). DMSO = диметилсульфоксид, HD = здоровый донор, IL-2 = интерлейкин-2, мл = миллилитр, нМ = наномолярный, пг = пикограмм.

[0066] На **фиг. 15А-фиг. 15D** показано, что Соединение 1 повторно стимулировало Т-клетки в анализе истощения стафилококкового энтеротоксина В. На **фиг. 15А** и **фиг. 15С** показаны схематические диаграммы анализа SEB-индуцированного истощения Т-клеток. Кратко, PBMC обрабатывали 100 нг/мл SEB в течение 72 часов и оценивали фенотип истощения Т-клеток с помощью анализа FACS для экспрессии PD-1 и LAG3. На **фиг. 15В** и **фиг. 15D** показаны уровни экспрессии PD-1 и LAG3 в контрольных и обработанных SEB клетках. FACS = сортировка флуоресцентно-активированных клеток, PBMC = моноклеарные клетки периферической крови, SEB = стафилококковый энтеротоксин В, sups = супернатанты.

[0067] На **фиг. 16** проиллюстрировано, что Соединения 2 и 3 снижали экспрессию Ikaros, Aiolos и ZFP91 в клетках SU-DHL-2 после обработки в течение 1, 2 или 6 часов контролем-носителем (0,1% DMSO), Соединением 1 (1, 10, 100 нМ), как измерено с помощью иммуноблоттинга.

[0068] На **фиг. 17** проиллюстрировано, что Соединение 1 (круг и сплошная линия) и Соединение 2 (треугольник и пунктирная линия) разрушали Ikaros зависимым от концентрации и времени образом в клетках DF-15, экспрессирующих Enhanced ProLabel (ePL)-Aiolos, ePL-Ikaros или ePL-ZFP91, после воздействия в течение 45 мин, 60 мин, 90 мин или 3 часов.

[0069] На **фиг. 18A** и **фиг. 18B** проиллюстрировано, что Соединение 1 не влияло на жизнеспособность клеток-предшественников нейтрофилов (CD34⁺), как измерено с помощью аннексина V и 7-актиномицина D (7-AAD) после воздействия DMSO (закрашенный кружок), 0,1 нМ (квадрат), 1 нМ (треугольник вверх), 10 нМ (треугольник вниз), 100 нМ (ромб) или 1000 нМ (пустой кружок) Соединением в течение 14 дней (**фиг. 18A**) или 5 дней, начиная с дня 9 (**фиг. 18B**).

[0070] На **фиг. 19A** и **фиг. 19B** проиллюстрировано, что процент зрелых (стадия IV) клеток восстановился после того, как клетки CD34⁺, полученные из костного мозга здорового донора, первоначально подверглись воздействию Соединением 1 в течение 14 дней (**фиг. 19A**) или в течение 5 дней, начиная с дня 9 (**фиг. 19B**), *ex vivo*, с последующей промывкой и повторной инкубацией в течение еще 7 дней в отсутствие Соединения 1. Данные представляют собой процент клеток стадии IV, определенных как CD34⁻/CD33⁻/CD11b⁺.

[0071] На **фиг. 20A** и **фиг. 20B** проиллюстрировано, что зрелые (стадия IV) клетки, восстановленные после того, как клетки CD34⁺, полученные из костного мозга здорового донора, подвергались воздействию 0,1 нМ (квадрат), 1 нМ (треугольник вверх) или 10 нМ (треугольник вниз) Соединением 1 в течение 14 дней (**фиг. 20A**) или 5 дней, начиная с дня 9 культивирования (**фиг. 20B**). DMSO (круг) служил в качестве контроля. Данные представляют собой процент клеток CD34⁺, полученных из костного мозга здорового донора, в процентах клеток стадии IV, определенных как CD34⁻/CD33⁻/CD11b⁺. Толстая черная линия показывает 50% клеток Стадии IV в контроле DMSO.

[0072] На **фиг. 21** проиллюстрировано, что Ikaros первоначально ингибируется после воздействия Соединением 1 в течение четырнадцати дней, а затем восстанавливается после промывки Соединением 1. Процент ингибирования Ikaros по сравнению с контролем DMSO при непрерывном воздействии Соединением 1 в течение 14 дней с недельной промывкой после обработки клеток от доноров № 1, № 2 и № 3. Ikaros измеряли способом проточной цитометрии каждые два или три дня. DMSO = диметилсульфоксид, нМ = наномолярный.

[0073] На **фиг. 22** проиллюстрировано, что процент ингибирования Ikaros первоначально ингибируется после непрерывного воздействия Соединением 1 в течение 5

дней, начиная с дня 9, а затем начинает восстанавливаться после однедельной промывки после обработки клеток от одного донора. Ikaros измеряли с помощью проточной цитометрии каждые два или три дня. DMSO = диметилсульфоксид, нМ = наномолярный.

[0074] На **фиг. 23** иллюстрирует, что ингибирование и восстановление белка Ikaros коррелирует с процентом популяции стадии IV во время миелоидной дифференцировки *ex vivo* клеток, происходящих из костного мозга CD34⁺, подвергавшихся воздействию 0,1 нМ (пустой треугольник, направленный вниз), 1,0 нМ (квадрат), 10 нМ (треугольник, направленный вверх), 100 нМ (ромб) или 1000 нМ (треугольник, закрашенный, направленный вниз) Соединением 1 в течение четырнадцати дней с недельной промывкой после обработки. На графике представлен процент клеток стадии IV, определенных как CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁺ (сплошные линии), относительно процента ингибирования белка Ikaros (пунктирные линии) по сравнению с контрольными культурами, обработанными DMSO (кружки) в течение 14 дней. Оба параметра измеряли способом проточной цитометрии каждые два или три дня. Представленные данные получены от 3 доноров.

[0075] На **фиг. 24** проиллюстрирована модель сети казуально-механических потоков для вывода эффектов Соединение 1 в моделях DLBCL. Протеомные эффекты измеряли через 6 и 18 часов, а транскрипционные эффекты измеряли через 12, 24 и 48 часов, и результаты объединяли для определения путей, модулируемых обработкой Соединением 1.

[0076] На **фиг. 25** проиллюстрированы иллюстративные пути и гены, участвующие в ответах на обработку Соединением 1, такие как гены, связанные с передачей сигналов интерферона (например, IL6ST, IFITM3, IFI6, OAS3, передача сигналов интерферона α/β), передачей сигнала цитокина/хемокина (например, IL23A, CCL1), апоптозом (например, IL27, TNF, IL10, каспаза), клеточной адгезией (например, SELE, SELPLG, TXA2PA), межклеточным соединением (например, CLDN7, CLDN12), сопряженными с G-белком рецепторами (например, FFAR2), внеклеточным матриксом (например, CD209, SERPINA, SERPINB7), клеточным циклом и транскрипцией.

[0077] На **фиг. 26A – фиг. 26C** проиллюстрированы ответы иллюстративных генов при обработке Соединением 1 через 12, 24 или 48 часов. Экспрессия IL23A (фиг. 26A), CCL2 (фиг. 26B) и SRGAP1 (фиг. 26C) повышалась после обработки Соединением 1 в чувствительных клеточных линиях по сравнению с промежуточными или резистентными клеточными линиями.

[0078] На **фиг. 27** проиллюстрированы уровни экспрессии белка панели генов, которые различным образом экспрессируются после обработки Соединением 1 в течение 6 или 18 часов.

5. Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0079] Способы, раскрытые в настоящем документе, частично основаны на обнаружении того, что измененный уровень, например, повышенный уровень и/или пониженный уровень, или обнаружение определенных молекул (например, мРНК, кДНК или белков) в биологическом образце можно использовать для идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, такой как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) или CLL/SLL, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, прогноза ответа субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, такой как DLBCL или CLL/SLL, на соединение для лечения, или контроля эффективности соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, где соединение представляет собой, например, Соединение 1 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, Соединение 2 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, или Соединение 3 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

5.1 Определения

[0080] В контексте настоящего изобретения термин «рак» включает без ограничения солидный рак и гематологический. Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Раком может быть рак гематопоетической и лимфоидной ткани. Гематопоетическая злокачественная опухоль относится к раку, поражающему кровь, костный мозг, лимфу и лимфатическую систему.

[0081] В контексте настоящего изобретения термин «диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL)» относится к новообразованию средних или крупных В-лимфоидных клеток, ядра которых имеют такой же размер или больше, чем ядра нормальных макрофагов, или более чем в два раз больший размер, чем ядра нормальных лимфоцитов, с диффузным характером роста. DLBCL представляет собой тип неходжкинской лимфомы (NHL) с по меньшей мере тремя известными подтипами: подтип В-клеток зародышевого центра (GCB), активированный В-клеточный подтип (ABC) и первичный медиастинальный подтип В-клеточной лимфомы (PMBL). Клетки DLBCL часто имеют одновременную перестройку MYC и/или BCL2, и/или BCL6. Например, в некоторых вариантах, DLBCL может включать хромосомные изменения гена BCL-6 в локусе 3q27, что имеет решающее значение при формировании зародышевого центра, а также дополнительные перестройки, влияющие на BCL6. Кроме того, DLBCL может иметь

генные перестройки, соответствующие, например, MYC, BCL2 или BCL6, в локус тяжелой цепи иммуноглобулина (IG), такой как t(8;14)(q24;q32) и/или t(14;18)(q32;q21.3). Транслокация MYC, BCL6 или BCL2 в локус *IG* обычно приводит к высоким уровням мРНК и белка из-за активной транскрипции, управляемой конститутивно активным промотором *IG*. Соответственно, клетки DLBCL часто имеют высокие уровни белка MYC, BCL6 или BCL2.

[0082] В контексте настоящего изобретения термин «субъект» или «пациент» означает животное, как правило, млекопитающее, включая человека, такого как пациент-человек. В контексте настоящего изобретения термин «здоровый субъект» означает индивидуума, который не страдает гематологической злокачественной опухолью, такой как DLBCL или CLL/SLL. Иллюстративный «здоровый субъект» не имеет ранее существовавших медицинских состояний. Однако понятно, что у «здорового субъекта» могут быть заболевания, не связанные с гематологической злокачественной опухолью, такие как, например, диабет, сердечно-сосудистые заболевания или любое другое заболевание или нарушение, которое не влияет на диагностику, лечение, уровень биомаркеров и/или фармакодинамику терапии гематологической злокачественной опухоли, такой как терапия DLBCL или CLL/SLL.

[0083] В контексте настоящего изобретения термин «вероятно» в общем относится к увеличению вероятности события. Термин «вероятно» при использовании в отношении ответа пациента, в целом предполагает повышенную вероятность того, что пациент будет отвечать на соединение для лечения. Термин «вероятно» при использовании в отношении ответа на соединение для лечения в целом предполагает повышенную вероятность того, что соединение уменьшит скорость прогрессирования заболевания или рост гематологических злокачественных опухолевых клеток. Термин «вероятно» при использовании в отношении ответа на соединение для лечения может также в целом означать увеличение индикаторов, таких как экспрессия мРНК или белка, которые могут свидетельствовать об усилении ответа на соединение для лечения.

[0084] В контексте настоящего изобретения термин «отвечающий» или «отвечаемость» при использовании в отношении лечения относится к степени эффективности лечения в уменьшении или ослаблении симптомов заболевания, например, DLBCL или CLL/SLL, которые подлежат лечению. Например, термин «повышенная отвечаемость» при использовании в отношении обработки клетки или лечения субъекта относится к повышению эффективности уменьшения или ослабления симптомов заболевания 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% или более. Однако также понятно, что отвечаемость также может остановить прогрессирование заболевания и необязательно требует уменьшения или ослабления симптомов заболевания.

[0085] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «рецидивирующее» относится к нарушению, заболеванию или состоянию, которое ответило на лечение (например, достигло полного ответа), а затем прогрессировало. Лечение может предусматривать одну или несколько линий терапии. Согласно одному варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние было ранее подвергнуто лечению одной или несколькими линиями терапии. Согласно другому варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние было ранее подвергнуто лечению одной, двумя, тремя или четырьмя линиями терапии. Согласно другому варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, например, DLBCL или CLL/SLL.

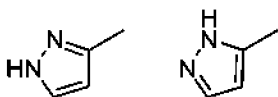
[0086] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное термин «невосприимчивое» относится к нарушению, заболеванию или состоянию, которое не ответило на предшествующее лечение, которое может предусматривать одну или несколько линий терапии. Согласно одному варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние было ранее подвергнуто лечению одной, двумя, тремя или четырьмя линиями терапии. Согласно одному варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние было ранее подвергнуто лечению двумя или более линиями лечения и показало меньший, чем полный ответ (CR) на самую последнюю схему лечения, содержащую системную терапию. Согласно одному варианту осуществления нарушение, заболевание или состояние представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, например, DLBCL или CLL/SLL.

[0087] Согласно одному варианту осуществления «рецидивирующий или невосприимчивый» CLL/SLL может относиться к CLL/SLL, который ранее был подвергнут лечению одной или несколькими линиями терапии. Согласно одному варианту осуществления рецидивирующий или невосприимчивый CLL/SLL представляет собой CLL/SLL, который ранее был подвергнут лечению одной, двумя, тремя или четырьмя линиями терапии. Согласно одному варианту осуществления рецидивирующий или невосприимчивый CLL/SLL представляет собой CLL/SLL, который ранее был подвергнут лечению двумя или более линиями терапии. Согласно одному варианту осуществления

рецидивирующий или невосприимчивый CLL/SLL представляет собой CLL/SLL, который ранее был подвергнут лечению ингибитором тирозинкиназы Брутона (BTK). Согласно одному варианту осуществления рецидивирующий или невосприимчивый CLL/SLL является рецидивирующим или невосприимчивым в отношении ингибитора BTK. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BTK представляет собой ибрутиниб. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BTK представляет собой акалабрутиниб. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BTK представляет собой занубрутиниб. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BTK представляет собой тирабрутиниб.

[0088] В контексте настоящего изобретения термин «соединение для лечения» относится к соединению формулы (I) и включает Соединение 1 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, Соединение 2 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, или Соединение 3 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Понятно, что соединения, раскрытые в настоящем документе, могут содержать хиральный центры. Такие хиральные центры могут быть либо (*R*), либо (*S*) конфигурации или могут быть их смесью. Должно быть понятно, что хиральные центры соединений, раскрытых в настоящем документе, могут подвергаться эпимеризации *in vivo*. Таким образом, специалисту в данной области техники понятно, что введение соединения в его (*R*) форме эквивалентно, для соединений которые подвергаются эпимеризации *in vivo*, введению соединения в его (*S*) форме. Оптически активные (+) и (-), (*R*)- и (*S*)- или (*D*)- и (*L*)-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или разделены с использованием обычных способов, таких как хроматография на хиральной неподвижной фазе. В описании настоящего изобретения, если имеется какое-либо несоответствие между химическим названием и химической структурой, структура имеет преобладающее значение.

[0089] 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:



[0090] Если специально не указано иное, соединение может принимать альтернативные таутомерные, региоизомерные и/или стереоизомерные формы, все альтернативные изомеры предназначены для охвата заявленным объектом изобретения. Например, когда соединение может иметь одну из двух таутомерных форм, предполагается, что оба таутомера охватываются настоящим изобретением. Таким образом, раскрытые в настоящем документе соединения могут быть энантиомерно чистыми или представлять собой стереоизомерные или диастереомерные смеси. В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «энантиомерно чистый» означает стереомерно чистую композицию соединения, имеющего один хиральный центр.

[0091] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «стереоизомер» или «стереоизомерно чистый» означает один стереоизомер соединения, которое по существу не содержит другие стереоизомеры этого соединения. Например, стереоизомерно чистое соединение, имеющее один хиральный центр, по существу не содержит противоположный энантиомер соединения. Стереоизомерно чистое соединение, имеющее два хиральных центра, практически не содержит другие диастереомеры соединения. Иллюстративное стереоизомерно чистое соединение содержит более приблизительно 80 мас.% одного стереоизмера соединения и менее приблизительно 20 мас.% другого стереоизмера соединения, более приблизительно 90 мас.% одного стереоизмера соединения и менее приблизительно 10 мас.% другого стереоизмера соединения, более приблизительно 95 мас.% одного стереоизмера соединения и менее приблизительно 5 мас.% другого стереоизмера соединения или более приблизительно 97 мас.% одного стереоизмера соединения и менее приблизительно 3 мас.% другого стереоизмера соединения. Соединения могут иметь хиральные центры и могут встречаться в виде рацематов, отдельных энантиомеров или диастереомеров и их смеси. Все такие изомерные формы охватываются вариантам осуществления, раскрытыми в настоящем документе, включая их смеси.

[0092] Применение стереоизомерно чистых форм таких соединений, а также применение смесей этих форм охватываются вариантам осуществления, раскрытыми в настоящем документе. Например, смеси, содержащие равные или неравные количества энантиомеров конкретного соединения, могут применяться в способах и композициях, раскрытых в настоящем документе. Эти изомеры могут быть асимметрично синтезированы или разделены с использованием стандартных способов, таких как хиральные колонки или

агенты хирального разделения. См., например, Jacques, J., *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981), Wilen, S. H., *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977), Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962), Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972), Todd, M., *Separation Of Enantiomers : Synthetic Methods* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014), Toda, F., *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods* (Springer Science & Business Media, 2007), Subramanian, G. *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach* (John Wiley & Sons, 2008), Ahuja, S., *Chiral Separation Methods for Pharmaceutical and Biotechnological Products* (John Wiley & Sons, 2011).

[0093] В контексте настоящего изобретения термин «изотополог» или «изотопологи» относится к изотопно-обогащенному соединению. Термин «изотопно-обогащенный» относится к атому или соединению, имеющему изотопный состав, отличный от встречающегося в природе изотопного состава этого атома или соединения. Радиоактивно меченные и изотопно-обогащенные соединения полезны в качестве терапевтических средств, например, терапевтических средств против гематологической злокачественной опухоли и воспаления, реагентов для исследования, например, реагентов для анализа связывания, и диагностических агентов, например, визуализирующих агентов *in vivo*. Все изотопные варианты соединений, как раскрыто в настоящем документе, являются ли они радиоактивными или нет, входят в объем вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Примеры изотопологов включают соединения, обогащенные дейтерием, углеродом-13 или азотом-15. Например, изотополог может представлять собой соединение, обогащенное дейтерием, такое как Соединение 1, 2, или 3, где дейтерирование происходит при хиральном центре.

[0094] Следует отметить, что если есть несоответствие между изображенной структурой и названием, приведенном к этой структуре, изображенная структура имеет преимущественное значение. Кроме того, если стереохимия структуры или части структуры не указана, например, жирные или пунктирные линии, структура или часть структуры должна интерпретироваться как охватывающая все ее стереоизомеры.

[0095] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «фармацевтически приемлемая соль (фармацевтически приемлемые соли)» относится к соли, полученной из фармацевтически приемлемой нетоксичной кислоты или основания, включая неорганическую кислоту и основание, и органическую кислоту и основание. Подходящие фармацевтически приемлемые соли добавления основания соединения, раскрытого в настоящем документе, включают без ограничения соли металлов, полученные

из алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка, или органические соли, полученные из лизина, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаина, холина, диэтанолamina, этилендиамин, меглумина (N-метил-глюкамина) и прокаина. Подходящие нетоксичные кислоты включают без ограничения неорганические и органические кислоты, такие как уксусная, альгиновая, антралиловая, бензолсульфоновая, бензойная, камфорсульфоновая, лимонная, этенсульфоновая, муравьиная, фумаровая, фуранкарбоновая, галактуронозная, глюконозная, глюкуронозная, глутаминозная, гликолевая, бромистоводородная, соляная, изетинозная, молочная, малеинозная, яблочная, миндальная, метансульфоновая, муцинозная, азотная, памовая, пантотеновая, фенилуксусная, фосфорная, пропионозная, салициловая, стеаринозная, янтарная, сульфаниловая, серная, винная кислоты и п-толуолсульфокислота. Другие хорошо известны в данной области техники, см., например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990) или Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995).

[0096] В контексте настоящего изобретения термин «образец» относится к материалу или смеси материалов, как правило, но необязательно, в жидкой форме, содержащим один или несколько представляющих интерес компонентов. Иллюстративный образец представляет собой «биологический образец», взятый у биологического субъекта, включая образец биологической ткани или жидкости, полученный, достигнутый или собранный *in vivo* или *in situ*. Биологический образец также включает образцы биологического субъекта, содержащие преаковые или раковые клетки или ткани. Такими образцами могут быть без ограничения органы, ткани и клетки, выделенные у млекопитающего. Иллюстративные биологические образцы включают без ограничения клеточный лизат, клеточную культуру, клеточную линию, ткань, ткань полости рта, ткань желудочно-кишечного тракта, орган, органеллу, биологическую жидкость, образец крови, образец мочи, образец кожи и тому подобное. Предпочтительные биологические образцы включают без ограничения цельную кровь, частично очищенную кровь, РВМС, биопсию тканей, включая биопсию костного мозга, аспират костного мозга, выделенные моноклеары костного мозга, циркулирующие опухолевые клетки и тому подобное.

[0097] «Биологический маркер» или «биомаркер» представляет собой вещество, обнаружение которого указывает на конкретное биологическое состояние, такое как, например, наличие гематологической злокачественной опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркеры можно определять индивидуально. Согласно другим вариантам осуществления несколько биомаркеров могут быть измерены одновременно.

[0098] Согласно некоторым вариантам осуществления «биомаркер» указывает на изменение уровня экспрессии мРНК, которое может коррелировать с риском или прогрессированием заболевания или с восприимчивостью заболевания к назначенному лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как мРНК или кДНК.

[0099] 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 специфических белков можно определить способами, известными в данной области техники. Например, можно применять способы на основе антител, такие как иммуноблоттинг, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) или другие способы.

[00100] Термины «полипептид» и «белок», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимеру из трех или более аминокислот в последовательном ряду, связанных пептидными связями. Термин «полипептид» включает белки, фрагменты белков, аналоги белков, олигопептиды и тому подобное. В контексте настоящего изобретения термин «полипептид» может также относиться к пептиду. Аминокислоты, составляющие полипептид, могут быть природного происхождения или могут быть синтетическими. Полипептид может быть очищен от биологического образца. Полипептид, белок или пептид также охватывает модифицированные полипептиды, белки и пептиды, например, гликополипептиды, гликопротеины или гликопептиды, или липополипептиды, липопротеины или липопептиды.

[00101] В контексте настоящего изобретения термин «уровень» относится к количеству, накоплению или скорости молекулы биомаркера. Уровень может быть представлен, например, количеством или скоростью синтеза информационной РНК (мРНК), кодируемой геном, количеством или скоростью синтеза полипептида или белка, кодируемого геном, или количеством или скоростью синтеза биологической молекулы, накопленной в клетке или биологической жидкости. Термин «уровень» относится к абсолютному количеству молекулы в образце или относительному количеству молекулы, определенному в стационарных или нестационарных условиях.

[00102] «Измененный уровень» означает количество, накопление или скорость молекулы биомаркера, отличающиеся от конкретного контроля. Измененный уровень может представлять собой либо снижение, либо увеличение, в зависимости от конкретного биомаркера и/или контроля, который используется для сравнения. Например, уровень

биомаркера, такой как уровень белка, может представлять собой измененный уровень, если он снижается в образце после введения соединения для лечения относительно необработанного образца. Однако тот же биомаркер может иметь измененный уровень, который повышается, если, например, контрольный уровень представляет собой обработанный образец в более ранний момент времени.

[00103] В контексте настоящего изобретения термин «контрольный уровень» предназначен для обозначения контрольного уровня биомаркера, используемого для оценки тестового уровня биомаркера в образце, взятом у индивидуума. Контрольный уровень может быть нормальным контрольным уровнем в образце, взятом у здорового субъекта, или контрольным уровнем заболевания у субъекта в болезненном состоянии. Нормальный контрольный уровень представляет собой степень экспрессии биомаркера у здорового субъекта или субъектов (т.е. без гематологической злокачественной опухоли). Контрольный уровень болезненного состояния представляет собой степень экспрессии биомаркера при положительном диагнозе заболевания или состояния. Контрольный уровень также может быть контрольным уровнем для конкретной стадии. Контрольный уровень для конкретной стадии относится к уровню биомаркера, характерному для данной стадии прогрессирования заболевания или состояния. Контрольный уровень также может представлять собой степень экспрессии биомаркера до лечения или в другое время в ходе лечения. Например, контрольным уровнем может быть степень экспрессии биомаркера в костном мозге до лечения. В другом примере контрольным уровнем может быть экспрессия биомаркера в крови в некоторый момент времени в ходе или после лечения.

[00104] В контексте настоящего изобретения термин «обнаруживаемый» при использовании в отношении биомаркера означает, что количество биомаркера превышает порог распознавания с использованием известных способов обнаружения биологических молекул, таких как иммунохимические или гистологические способы. Например, определяемым уровнем биомаркера с помощью иммуноблоттинга может быть уровень выше фона и/или уровня отрицательного контроля (например, отсутствие образца). В качестве альтернативы, определяемый уровень биомаркера с использованием, например, количественной ОТ-ПЦР (кПЦР), может представлять собой уровень, который обнаруживается при более раннем номере цикла, чем номер цикла обнаружения для реакции кПЦР с использованием отрицательного контроля (например, воды). Кроме того, должно быть понятно, что обнаруживаемый уровень может относиться к качественному или количественному определению присутствия или концентрации исследуемой биомолекулы, и что описанные выше анализы являются лишь иллюстративными.

[00105] В контексте настоящего изобретения термины «прогнозировать» или

«прогнозирование» в общем означают предварительное определение или сообщение. При использовании для «прогнозирования» ответа на лечение, например, термин «прогнозирование» может означать, что вероятность ответа или отсутствия ответа на лечение гематологической злокачественной опухоли может быть определена в самом начале, до начала лечения или до того, как период лечения значительно продвинется.

[00106] В контексте настоящего изобретения термины «контролировать» или «контроль» в общем относятся к контролю, надзору, регулированию, наблюдению, отслеживанию или изучению активности. Например, термин «контроль эффективности соединения» относится к отслеживанию эффективности при лечении гематологической злокачественной опухоли у пациента или в культуре опухолевых клеток. Подобным 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 тестируется в соответствии с предписаниями. Контроль можно проводить, например, путем отслеживания экспрессии биомаркеров мРНК или белка.

[00107] В контексте настоящего изобретения термин «эффективность» относится к способности приводить к желаемому или предполагаемому результату. При использовании в отношении эффективности соединения для лечения термин «эффективность» означает снижение или ингибирование роста или прогрессирования гематологической злокачественной опухоли, такой как DLBCL или CLL/SLL. Это также может относиться к предотвращению повторного возникновения или рецидива гематологической злокачественной опухоли, такой как DLBCL или CLL/SLL.

[00108] В контексте настоящего изобретения термин «моменты времени» относится к образцам, которые получают через отдельные промежутки времени, достаточно разнесенные во времени, чтобы обеспечить ответ, если он ожидается. Момент времени может быть до, в ходе или после лечения. Понятно, что на каждой стадии цикла лечения можно брать несколько временных точек. Например, образец можно брать более чем за месяц до лечения и повторно непосредственно перед лечением, или два раза в день в ходе лечения, или до, в ходе и после лечения. Понятно, что приведенные выше примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

[00109] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» соединения относятся к количеству, достаточному для обеспечения терапевтического эффекта при лечении, профилактике и/или контроле заболевания, например, DLBCL или CLL/SLL, или

для отсрочки или сведения к минимуму одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, подлежащими лечению. Термины «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество» могут охватывать количество, которое улучшает общую терапию, уменьшает или устраняет симптомы или причины заболевания или нарушения или повышает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства.

[00110] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное термины «лечить», «лечение» и «обработка» относятся к полному или частичному облегчению нарушения, заболевания или состояния, или одного или нескольких симптомов, связанных с нарушением, заболеванием или состоянием, или к замедлению или прекращению дальнейшего прогрессирования или ухудшения этих симптомов, или облегчению или устранению причины (причин) самого нарушения, заболевания или состояния, например, гематологической злокачественной опухоли, такой как DLBCL или CLL/SLL.

[00111] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное, термин «профилактика» означает способ замедления и/или предотвращения возникновения, рецидива или распространения, полностью или частично, нарушения, заболевания или состояния, недопущение приобретения субъектом нарушения, заболевания или состояния или снижение риска возникновения нарушения, заболевания или состояния.

[00112] В контексте настоящего изобретения и если не указано иное термин «контроль» включает предотвращение рецидива конкретного заболевания или нарушения у пациента, который страдал им, удлинение периода ремиссии у пациента, страдавшего этим заболеванием или нарушением, снижение показателей смертности пациентов и/или поддержание снижения тяжести или предотвращения симптома, связанного с заболеванием или состоянием, которое подлежит контролю.

[00113] В контексте настоящего изобретения термины «близко», «приблизительно» или «около» относятся к уровню, который находится в пределах близкого диапазона контрольного уровня. Уровень биомаркера, который находится при или около контрольного уровня, может быть ниже или выше контрольного уровня, так что он находится в диапазоне диапазона 50% или выше контрольного уровня. Специалистам в данной области техники понятно, что уровень биомаркера необязательно должен быть равен контрольному уровню биомаркера, чтобы его можно было считать, что он находится при или около контрольного уровня биомаркера. Иллюстративный уровень биомаркера, который находится при или около уровня биомаркера контрольного образца, может находиться в пределах 75-125% от контрольного уровня.

[00114] В контексте настоящего изобретения термин «нейтрофил» относится к

дифференцированным миелоидным клеткам. Нейтрофилы можно охарактеризовать экспрессией поверхностного маркера CD11b и отсутствием или почти отсутствием поверхностных маркеров CD34 и CD33 (то есть CD11b⁺, CD34⁻ и CD33⁻). Специалистам в данной области техники понятно, что экспрессия или отсутствие экспрессии маркера необязательно должны быть абсолютными. Например, нейтрофил может экспрессировать низкий уровень CD34 и характеризоваться как CD34⁻. Точно так же клетка может экспрессировать умеренные, но определяемые уровни CD11b и характеризоваться как CD11b⁺. Уровни экспрессии могут быть определены эмпирически как человеком, так и инструментом, используемым для измерения маркеров.

[00115] В контексте настоящего изобретения термин «второй активный агент» относится к любому дополнительному лечению, которое является биологически активным. Понятно, что второй активный агент может представлять собой гемопоетический фактор роста, цитокин, противораковый агент, антибиотик, ингибитор соx-2, иммуномодулирующий агент, иммунодепрессант, кортикостероид, терапевтическое антитело, которое специфически связывается с раковым антигеном или его фармакологически активный мутант или производное. Иллюстративные вторые активные агенты включают без ограничения ингибитор HDAC (например, панобиностат, ромидепсин, вориностат или цитариностат), ингибитор BCL2 (например, венетоклакс), ингибитор ВТК (например, ибрутиниб или акалабрутиниб), ингибитор mTOR (например, эверолимус), ингибитор PI3K (например, иделалисиб), ингибитор PKC β (например, энзастаурин), ингибитор SYK (например, фостаматиниб), ингибитор JAK2 γ (например, федраитниб, пакритиниб, руксолитиниб, барицитиниб, гандотиниб, лестауртиниб или момелотиниб), ингибитор киназы Auroga A (например, алисертиб), ингибитор EZH2 (например, таземетостат, GSK126, CPI-1205, 3-деазанепланоцин A, EPZ005687, EI1, UNC1999 или синефунгин), ингибитор BET (например, бирабресибиб или 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он), гипометилирующий агент (например, 5-азациитидин или децитабин), химиотерапевтическое средство (например, бендамустин, доксорубицин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, ифосфамид, мелфалан, оксалиплатин или дексаметазон) или эпигенетическое соединение (например, ингибитор DOT1L, такой как пинометостат, ингибитор HAT, такой как C646, ингибитор WDR5, такой как OICR-9429, селективный ингибитор DNMT1, такой как GSK3484862, ингибитор LSD-1, такой как Соединение С или секлидемстат, ингибитор G9A, такой как UNC0631, ингибитор PRMT5, такой как GSK3326595, ингибитор бромодомена (BRD) (например, ингибитор BRD9/7, такой как LP99), ингибитор SUV420H1/H2, такой как A-196, или ингибитор CARM1, такой как EZM2302).

[00116] В контексте настоящего изобретения термин «поддерживающая терапия» относится к любому веществу, которое лечит, предотвращает или контролирует неблагоприятный эффект от лечения с помощью Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3, или их энантиомера, или смеси энантиомеров, таутомеров, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Понятно, что термин «поддерживающая терапия» относится к любому терапевтическому средству, которое в основном направлено на поддержание сил и/или комфорта пациента. Примеры поддерживающей терапии включают без ограничения терапию для контроля боли, внутривенные жидкости и электролитную поддержку, такую как изотонический солевой раствор, солевой раствор глюкозы или сбалансированные кристаллоидные растворы.

[00117] В контексте настоящего изобретения термин «источник» при использовании в отношении контрольного образца относится к происхождению образца. Например, образец, взятый из крови, будет иметь контрольный образец, который также взят из крови. Точно так же образец, взятый из костного мозга, будет иметь контрольный образец, который также взят из костного мозга.

[00118] В контексте настоящего изобретения термин «экспрессированный» или «экспрессия» относится к транскрипции из гена с образованием 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 из молекулы РНК с получением белка, полипептида или их части.

[00119] Термины «цереблон» или «CRBN» и аналогичные термины относятся к полипептидам (термины «полипептиды», «пептиды» и «белки» используются в настоящем документе взаимозаменяемо), содержащим аминокислотную последовательность любого CRBN, такого как белок CRBN человека (например, изоформа 1 CRBN человека, номер доступа GenBank NP_057386, или изоформа 2 CRBN человека, номер доступа GenBank NP_001166953, каждый из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), и родственным полипептидам, включая их варианты SNP. Родственные полипептиды CRBN включают аллельные варианты (например, варианты SNP), варианты сплайсинга, фрагменты, производные, вариант замены, вариант делеции, вариант вставки, слитые полипептиды и межвидовые гомологи, которые, согласно определенным вариантам осуществления, сохраняют активность CRBN и/или являются достаточными для создания иммунного ответа против CRBN.

[00120] В контексте настоящего изобретения термин «цереблон-ассоциированный белок» или «CAP» относится к белку, который прямо или косвенно

взаимодействует или связывается с цереблоном (CRBN). Например, этот термин относится к любому белку, который напрямую связывается с цереблоном, а также к любому белку, который является непрямым нижестоящим эффектором путей CRBN. Примером CAP является субстрат CRBN, например, белковый субстрат комплекса убиквитинлигазы E3, включающего CRBN, такой как IKZF1, IKZF3 или ZFP91.

[00121] В контексте настоящего изобретения термин «интерферон-индуцируемый ген» относится к генам, экспрессия которых увеличивается в ответ на передачу сигналов, опосредованную интерфероном I типа. Например, связывание интерферонов (IFN) с рецептором IFN1 типа может запускать активацию сигнального каскада, ответственного за индукцию интерферон-индуцируемого гена. Иллюстративные гены включают регуляторный фактор интерферона 7 (IRF7), интерферон-индуцированный белок с тетрапептидными повторами 3 (IFIT3) и белок DEAD box 58 (DDX58).

[00122] В контексте настоящего изобретения термин «ассоциированный с» при использовании в отношении сигнального пути, клеточного процесса или клеточного признака означает, что молекула является членом группы молекул в клетке, которые работают вместе, например, для контроля определенного процесса или функции. Понятно, что молекула может быть связана с сигнальным путем, поскольку она прямо или косвенно участвует в распространении передачи сигнала, такой как передача сигнала интерферона или передача сигнала цитокина/хемокина. Молекула также может быть связана с клеточным процессом или признаком, таким как, например, клеточная адгезия, межклеточное соединение, сопряженный с G-белком рецептор, внеклеточный матрикс, клеточный цикл или транскрипция, поскольку молекула прямо или косвенно участвует в этом клеточном процессе или признаке.

[00123] В контексте настоящего изобретения термины «Т-клеточная активация» и «активированная Т-клетка» означают клеточную активацию покоящихся наивных Т-клеток в эффекторные Т-клетки, которые способны индуцировать гибель опухолевых клеток. Активация Т-клеток может быть инициирована взаимодействием комплекса Т-клеточный рецептор (TCR)/CD3 с антигеном. Иллюстративная активированная Т-клетка проявляет клеточные ответы, которые включают без ограничения пролиферацию клеток, секрецию цитокинов и/или эффекторную функцию. В контексте настоящего изобретения Т-клеточная активация может быть вызвана обработкой Соединением 1 или его таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, Соединением 2 или его таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, или Соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью.

[00124] В контексте настоящего изобретения термин «цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией» относится к любому из многочисленных факторов, которые секретируются активированными Т-клетками или секреция которых увеличивается в активированных Т-клетках по сравнению с покоящимися наивными Т-клетками. Иллюстративный цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией, включает интерлейкин-2 (IL-2).

[00125] Термины «антитело», «иммуноглобулин» или «Ig», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, охватывают полностью собранные антитела и фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Антитела, представленные в настоящем документе, включают без ограничения синтетические антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, интратела, одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифические, биспецифические и т. д.), верблужьи антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В частности, антитела, раскрытые в настоящем документе, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, т.е. антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с антигеном CRBN (например, одна или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) анти-CRBN антитела). Иммуноглобулины могут состоять из тяжелых цепей и легких цепей. Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CRBN-антитела являются полностью человеческими, такими как полностью человеческие моноклональные анти-CRBN-антитела. Согласно определенным вариантам осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, представляют собой антитела IgG или их подкласс (например, IgG1 или IgG4 человека). Согласно другому варианту осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, то есть антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается, например, с Aiolos, Ikaros, c-MYC, IRF4, Caspase-3 или любыми биомаркерами, раскрытыми в настоящем документе.

[00126] В контексте настоящего изобретения термины «иммуноспецифически связывает», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывает» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном/эпитопом, как такое связывание понимается специалистом в данной области техники. Антитела, которые специфически связываются со структурой-мишенью или ее субъединицей, не вступают в перекрестную реакцию с биологическими молекулами, не входящими в семейство структур-мишеней. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела связывается с выбранным антигеном со специфической аффинностью более 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или 10^{-11} М, от 10^{-8} М до 10^{-11} М, от 10^{-9} М до 10^{-10} М и от 10^{-10} М до 10^{-11} М. Например, молекула (например, антитело), которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммунологических анализов или других анализов, известных в данной области техники. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, не вступают в перекрестную реакцию с другими белками.

[00127] В контексте настоящего изобретения термин «эпитоп» относится к локализованной области на поверхности антигена, которая способна связываться с одной или несколькими антигенсвязывающими областями антитела, обладающего антигенной или иммуногенной активностью у животного, такого как млекопитающее (например, человек), и это способно вызывать иммунный ответ. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой часть полипептида, вызывающую гуморальный ответ у животного. Эпитоп, обладающий антигенной активностью, представляет собой часть полипептида, с которой антитело иммуноспецифически связывается, что определяется любым способом, хорошо известным в данной области техники, например, с помощью иммуноанализов, описанных в настоящем документе. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Область полипептида, входящая в состав эпитопа, может представлять собой смежные аминокислоты полипептида, или эпитоп может состоять из двух или более несмежных областей полипептида. Эпитоп может представлять собой или не представлять собой трехмерный элемент поверхности антигена.

[00128] В контексте настоящего изобретения термины «определение», «измерение», «оценка», «исследование» и «анализ» обычно относятся к любой форме

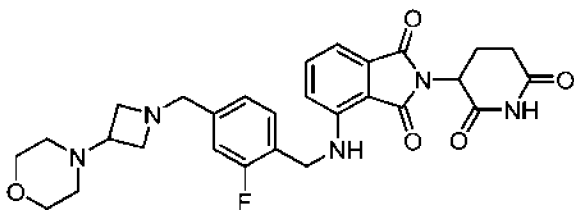
измерения и включают определение того, присутствует элемент или нет. Эти термины включают количественные и/или качественные определения. Оценка может быть относительной или абсолютной. «Оценка присутствия» может включать определение количества какого-либо присутствующего вещества, а также определение того, присутствует оно или отсутствует.

[00129] В контексте настоящего изобретения термин «детектируемая метка» относится к присоединению специфической метки к антителу для помощи в обнаружении или выделении/очистке белка. Примеры типов меток включают без ограничения радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), хемилюминесценцию, ферментные репортеры и элементарные частицы (например, частицы золота). Обнаружение может быть прямым или косвенным. Оптические способы включают микроскопию (как конфокальную, так и неконфокальную), визуализирующие и невизуализирующие способы. К электрохимическим способам относятся способы вольтамперометрии и амперометрии. Радиочастотные способы включают мультиполярную резонансную спектроскопию.

[00130] 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 (2d ed. 1989), Glover, ed., DNA Cloning, Volumes I and II (1985), Gait, ed., Oligonucleotide Synthesis (1984), Hames & Higgins, eds., Nucleic Acid Hybridization (1984), Hames & Higgins, eds., Transcription and Translation (1984), Freshney, ed., Animal Cell Culture: Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London), Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer Verlag, N.Y., 2d ed. 1987), и Weir & Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (1986).

5.2 Соединения

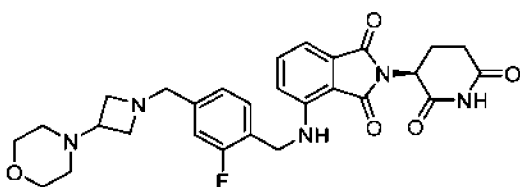
[00131] Согласно некоторым вариантам осуществления различных способов, раскрытых в настоящем документе, соединением являются соединения формулы (I):



(I),

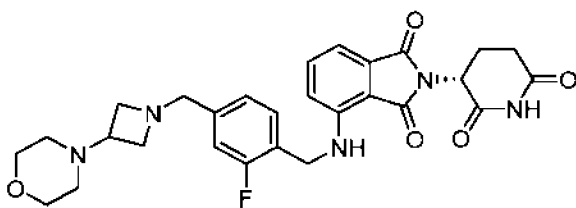
или их энантиомер или смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль.

[00132] Согласно определенным вариантам осуществления различных способов, раскрытых в настоящем документе, соединение представляет собой (S)- 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1):



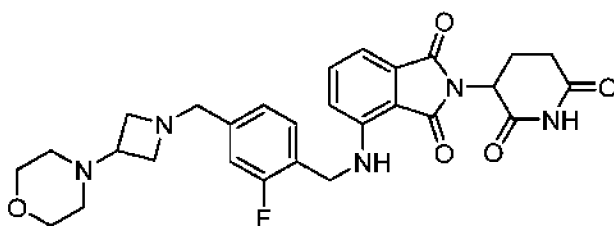
или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Способы получения Соединения 1 описаны в заявке на патент США № 16/390815, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00133] Согласно другим вариантам осуществления различных способов, раскрытых в настоящем документе, соединение представляет собой (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 2):



или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[00134] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение содержит смесь (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона и (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3):



или их энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

[00135] Различные соединения, раскрытые в настоящем документе, могут содержать хиральные центры и могут существовать в виде смеси энантиомеров (например, рацемические смеси) или смеси диастереомеров. Такие хиральные центры могут иметь конфигурацию (*R*) или (*S*) или могут представлять собой их смесь. Очевидно, что хиральные центры соединений, раскрытых в настоящем документе, могут подвергаться эпимеризации *in vivo*. Специалисту в данной области техники понятно, что введение соединения в его (*R*) форме эквивалентно введению соединения в его (*S*) форме для соединений, которые подвергаются эпимеризации *in vivo*. Способы, раскрытые в настоящем документе, охватывают применение стереомерно чистых форм таких соединений, а также смесей этих форм. Например, смеси, содержащие равные или неравные количества энантиомеров конкретного соединения, можно применять в способах, раскрытых в настоящем документе. Эти изомеры могут быть синтезированы асимметрично или разделены с использованием стандартных способов, таких как хиральные колонки или хиральные разделяющие агенты. См., Jacques *et al.*, Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley-Interscience, New York, 1981), Wilen *et al.*, *Tetrahedron* 1977, 33:2725-2736, Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962), Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions, p. 268 (Eliel, ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

[00136] Настоящее изобретение также охватывает изотопно-обогащенные аналоги соединений, раскрытых в настоящем документе. Изотопное обогащение (например, дейтерирование) фармацевтических средств для улучшения фармакокинетики («PK»), фармакодинамики («PD») и профилей токсичности было продемонстрировано ранее с некоторыми классами лекарственных средств. 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).

[00137] 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 (6) 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.

[00138] Замена атома одним из его изотопов часто приводит к изменению скорости химической реакции. Это явление известно как кинетический изотопный эффект («KIE»). 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)).

[00139] 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.

[00140] 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.

[00141] 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.

[00142] Организм животного вырабатывает множество ферментов с целью устранения инородных веществ, таких как терапевтические средства, из системы кровообращения. Примеры таких ферментов включают ферменты цитохрома P450 («CYP»), эстеразы, протеазы, редуктазы, дегидрогеназы и моноаминоксидазы, которые реагируют с этими чужеродными веществами и превращают их в более полярные промежуточные соединения или метаболиты для почечной экскреции. Некоторые из наиболее распространенных метаболических реакций фармацевтических соединений включают окисление углерод-водородной (C-H) связи либо до углерод-кислородной (C-O), либо до углерод-углеродной (C-C) пи-связи. Полученные метаболиты могут быть стабильными или нестабильными в физиологических условиях и могут иметь существенно отличающиеся фармакокинетические, фармакодинамические профили, а также профили острой и долгосрочной токсичности по сравнению с исходными соединениями. Для многих лекарственных средств такое окисление протекает быстро. В результате эти лекарственные средства часто требуют введения многократных или высоких дневных доз.

[00143] Изотопное обогащение в определенных положениях соединения, раскрытого в настоящем документе, может привести к обнаруживаемому КИЕ, который влияет на фармакокинетические, фармакологические и/или токсикологические профили соединения, раскрытого в настоящем документе, по сравнению с подобным соединением, имеющим природный изотопный состав. Согласно одному варианту осуществления обогащение дейтерием проводят в сайте разрыва связи C-H в процессе метаболизма.

[00144] Доступны стандартные физиологические, фармакологические и биохимические методики тестирования соединений с целью выявления тех соединений, которые обладают желаемой антипролиферативной активностью.

[00145] Такие анализы включают, например, биохимические анализы, такие как анализы связывания, анализы включения радиоактивности, а также различные анализы на основе клеток.

[00146] Соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники, например, в соответствии с процедурой, описанной в Патенте США №. 8518972 В2 или заявке США № 16/390815, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры способов получения соединений, представленных в настоящем документе, описаны в примерах 1-3 раздела 6.

5.3 Биомаркеры и способы их применения

[00147] Способы, раскрытые в настоящем документе частично основаны на обнаружении того, что обнаруживаемое увеличение или уменьшение определенных биомаркеров при лечении соединением наблюдается у субъектов с гематологической злокачественной опухолью, такой как, например, DLBCL или CLL/SLL, которые отвечают на данное лечение, например, соединением, таким как Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль, как описано в разделе 5.2 выше. Уровни этих биомаркеров могут быть использованы для выявления или измерения отвечаемости субъектов на лечение, а также облегчения лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни биомаркеров могут прогнозировать ответ на соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль

содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00148] Как описано в Примерах в разделе 6 и показано на чертежах, уровни определенных белков, молекул, мРНК или клеточного состава изменяются в ответ на лечение соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Эти биомаркеры включают маркеры апоптоза, цереблон (CRBN)-ассоциированные белки и интерферон-индуцируемые гены. Например, как раскрыто в настоящем документе, лечение клеток DLBCL, которые отвечают на соединение формулы (I), такое как Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, индуцировало апоптоз, снижало экспрессию CRBN-ассоциированных белков и повышало экспрессию интерферон-индуцируемых генов по сравнению с необработанными клетками и неответающими клетками. Однако должно быть понятно, что при определенных обстоятельствах биомаркеры, описанные в настоящем документе, необязательно должны иметь измененный уровень (т.е. увеличение или уменьшение). Например, согласно определенным вариантам осуществления основная экспрессия белка перед введением дозы соединения для лечения субъекту может прогнозировать чувствительность или отвечаемость на лечение соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Таким образом, биомаркеры, раскрытые в настоящем документе, могут быть полезны для выявления или измерения отвечаемости субъектов на лечение, контроля эффективности лечения, а также облегчения лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, такой как DLBCL или CLL/SLL.

[00149] Согласно определенным аспектам биомаркер, полезный в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой маркер апоптоза. Как раскрыто в настоящем документе, обработка гематологических злокачественных опухолевых клеток, таких как клетки DLBCL или CLL/SLL, которые чувствительны к соединению формулы (I) или его энантиомеру, смеси энантиомеров, таутомеру, изотопологу или фармацевтически приемлемой соли, может повышать экспрессию и/или повышать активность проапоптических белков, снижать экспрессию и/или активность антиапоптических белков

и приводить к индукции апоптоза. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления изменение уровня биомаркера является показателем индукции апоптоза. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, являющийся показателем индукции апоптоза, представляет собой расщепляющую каспазу 3, расщепляющую каспазу 7, расщепленную поли(ADP-рибоза)полимеразу (PARP), BCL2, сурвивин, фосфатидилсерин (PS) и ДНК, Bcl-2-подобный белок 11 (BIM), интерлейкин 27 (IL27), фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин 10 (IL10) или их комбинацию. Биомаркером, который является показателем индукции апоптоза, также может быть обнаружение зонда или суррогатного маркера, такого как Аннексин-V, ярко-красный антрахинон 7 (DRAQ7) и/или 7-амино-актиномицин D (7- AAD), которые связываются с эндогенными белками и молекулами (например, фосфатидилсерином, ДНК, соответственно) в апоптотических клетках, и при обнаружении которых различают жизнеспособные, апоптотические и поздние апоптотические/мертвые клетки. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер, который является показателем индукции апоптоза, включает Аннексин-V, DRAQ7, 7-AAD или их комбинацию.

[00150] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер, который является показателем апоптоза, в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень биомаркера, который является показателем апоптоза, после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, а более высокий уровень расщепляющей каспазы 3, расщепляющей каспазы 7, расщепленной поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), BCL2, сурвивина, фосфатидилсерина (PS) и ДНК, Bcl-2-подобного белка 11 (BIM), интерлейкина 27 (IL27), фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкина 10 (IL10), Аннексин-V, DRAQ7, 7-AAD или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть выше контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более низкий уровень биомаркера, который является показателем апоптоза, перед вторым введением является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью.

Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00151] Согласно некоторым аспектам биомаркер, полезный в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой CRBN-ассоциированный белок или мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка. Как раскрыто в настоящем документе, соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль способны связываться с CRBN, и экспрессия CRBN требуется для опосредования эффектов лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой цереблон (CRBN), и субъект диагностирован как вероятно отвечающий на лечение соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, если CRBN является обнаруживаемым или выше контрольного уровня в образце.

[00152] CRBN представляет собой убиквитинлигазу E3, которая, как известно, способствует разрушению различных субстратов, включая Ikaros (также известный как IKZF1), Aiolos (также известный как IKZF3) и ZFP91 (см., например, патент США № 9857359 B2, заявки на патент США № 15/101869 и 15/518472, опубликованные как U.S. 2017-0242014A1 и U.S. 2016-0313300A1, соответственно, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Как раскрыто в настоящем документе, обработка гематологических злокачественных опухолевых клеток соединением формулы (I) приводит к разрушению CRBN-ассоциированных белков Ikaros, Aiolos и ZFP91, что соответствует сильным антипролиферативным эффектам соединения формулы (I). Кроме того, обработка гематологических злокачественных опухолевых клеток соединением формулы (I) приводит к дерепрессии интерферон-индуцируемых генов (ISG), регуляторного фактора интерферона 7 (IRF7), интерферон-индуцируемого белка с тетрапептидными повторами 3 (IFIT3) и геликазы DExD/H-box (DDX58), а также к сокращению весьма критических факторов транскрипции c-Myc/MYC, BCL6 и IRF4. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой CRBN-ассоциированный белок (CAP) или мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка. Согласно конкретным вариантам осуществления CRBN-ассоциированный белок представляет собой IKAROS, AIOLOS или ZFP91. Согласно другим вариантам осуществления мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка представляет собой BCL6, c-MYC или IRF4.

[00153] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой CRBN-ассоциированный белок (CAP) или мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка, и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень CRBN-ассоциированного белка (CAP) или мишени транскрипции CRBN-ассоциированного белка после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень Ikaros, Aiolos, ZFP91, BCL6, c-MYC, IRF4 или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть ниже контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более высокий уровень биомаркера является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00154] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер содержит интерферон-индуцируемый ген. Согласно конкретным вариантам осуществления интерферон-индуцируемый ген включает регуляторный фактор интерферона 7 (IRF7), интерферон-индуцированный белок с тетратрикопептидными повторами 3 (IFIT3), белок DEAD box 58 (DDX58) или их комбинацию. Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер представляет собой интерферон-индуцируемый ген, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень интерферон-индуцируемого гена после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень IRF7, IFIT3, DDX58 или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности

лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть выше контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более низкий уровень биомаркера является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00155] Как описано в настоящем документе, обработка гематологических злокачественных опухолевых клеток соединением формулы (I) ингибирует пролиферацию гематологических злокачественных опухолевых клеток относительно необработанных клеток. Это подтверждается повышением экспрессии ингибитора пролиферации, ингибитора циклинзависимой киназы 1 (p21). Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер пролиферации. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер представляет собой p21. Понятно, что биомаркером также может быть маркер повышенной пролиферации, и он необязательно должен представлять собой ингибитор пролиферации. Например, маркером может быть маркер пролиферации (например, BrdU, Ki-67, H3pS10 или подобный маркер), который снижается при лечении соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью.

[00156] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер пролиферации и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень маркера пролиферации после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень p21 в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть ниже контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень

биомаркера после первого введения биомаркера, и более высокий уровень маркера пролиферации является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00157] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемическая смесь, также может влиять на нераковые клетки, такие как эндотелиальные клетки, Т- и В-лимфоциты, фибробласты и макрофаги. Клетки, окружающие злокачественную клетку (т.е. микроокружение опухоли), могут воздействовать на злокачественную клетку. Например, противовоспалительные и иммуномодулирующие сигналы также могут способствовать лечению гематологической злокачественной опухоли. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер находится в нераковой клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер выбирают из группы, состоящей из IL-8, IL-1a, sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, коллаген-I и -III, PAI-1, CD69, sIL-10 или их комбинации. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть ниже контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер выбирают из группы, состоящей из IL-8, IL-1a, sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, коллаген-I и -III, PAI-1, CD69, sIL-10 или их комбинации, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень IL-8, IL-1a, sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, CD-69, коллаген-I и -III, PAI-1 или их комбинации после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно другим вариантам осуществления, контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень IL-8, sIL-10, sIL-2, sIL-6 или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения.

[00158] Также было замечено, что обработка Соединением 1 приводила к Ikaros/Aiolos-управляемой повышающей регуляции генов, ассоциированных с передачей сигнала интерферона (например, IL6ST, IFITM3, IFI6, OAS3, интерферон α/β передача сигнала), передачей сигнала цитокина/хемокина (например, IL23A, CCL1), апоптозом

(например, IL27, TNF, IL10, каспаза), клеточной адгезией (например, SELE, SELPLG, TXA2PA), межклеточным соединением (например, CLDN7, CLDN12), сопряженными с G-белком рецепторами (например, FFAR2), внеклеточным матриксом (например, CD209, SERPINA, SERPINB7), и глобальной понижающей регуляции генов, ассоциированных с клеточным циклом и транскрипцией. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер связан с передачей сигнала интерферона. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер, связанный с передачей сигнала интерферона, включает сигнальный трансдуктор интерлейкина-6 (IL6ST), интерферон-индуцируемый трансмембранный белок 3 (IFITM3), интерферон альфа-индуцируемый белок 6 (IFI6), 2'-5'-олигоаденилатсинтазу 3 (OAS3), интерферон α (IFN α), интерферон β (IFN β) или их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер передачи сигнала интерферона, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00159] Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер связан с передачей сигнала цитокина/хемокина. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер, связанный с передачей сигнала цитокина/хемокина, включает субъединицу альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 1 (CCL1) или их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с передачей сигнала цитокина/хемокина, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00160] Согласно другим вариантам осуществления биомаркер связан с клеточной адгезией. Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер, связанный с клеточной адгезией, включает E-селектин (SELE), гликопротеиновый лиганд P-селектина 1 (SELPLG), тромбоксан A2 (TXA2) или их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с клеточной адгезией, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00161] Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер связан с межклеточным соединением. Согласно определенным вариантам осуществления

биомаркер, связанный с межклеточным соединением, включает клаудин 7 (CLDN7), клаудин 12 (CLDN12) или их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с межклеточным соединением и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00162] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой сопряженный с G-белком рецептор. Согласно определенным вариантам осуществления сопряженный с G-белком рецептор включает рецептор свободной жирной кислоты 2 (FFAR2). Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер представляет собой сопряженный с G-белком рецептор, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00163] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер связан с внеклеточным матриксом. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер, связанный с внеклеточным матриксом, включает CD209, SERPINA, SERPINB7 или их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с внеклеточным матриксом и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00164] Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер связан с клеточным циклом. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с клеточным циклом, и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00165] Согласно другим вариантам осуществления биомаркер связан с транскрипцией. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер связан с транскрипцией, и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, где контрольный уровень относится к образцу, обработанному DMSO.

[00166] Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер

представляет собой уровень белка для белка, который изменяет экспрессию при лечении соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Согласно конкретным вариантам осуществления биомаркер представляет собой один или несколько белков, выбранных из группы, состоящей из Aiolos (IKZF3), Ikaros (IKZF1), E3 убиквитинпротеинлигазы ZFP91 (ZFP91), белка C-ets-1 (ETS1), Мах-связывающего белка MNT (MNT), миоцит-специфического энхансерного фактора 2B (MEF2B), субъединицы 1 snRNA-активирующего белкового комплекса (SNAPC1), лизин-специфической деметилазы 4B (KDM4B), фактора транскрипции AP-4 (TFAP4), ядерного фактора транскрипции 1 (UBTF), белка 1, содержащего смежный гомологичный бромодомен (BAHD1), белка 4, содержащего метил-CpG-связывающий домен 4 (MBD4), гомолога белка хромобокса 2 (CBX2), опухолевого белка 63 (TP63), трансдуктин-подобного белка энхансера 3 (TLE3), белка forkhead box P1 (FOXP1), белка 11, содержащего цинковый палец и домен BTB (ZBTB11), регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), медиатора субъединицы транскрипции РНК-полимеразы II 26 (MED26), циклический AMP-зависимого фактора транскрипции ATF-7 (ATF7), белка 644 цинкового пальца (ZNF644), лизин-специфической деметилазы 5B (KDM5B), вышестоящего стимулирующего фактора 2 (USF2), фактора транскрипции 25 (TCF25), лизин-специфической деметилазы 4A (KDM4A), летального (3) белка 2, подобного злокачественной опухоли головного мозга (L3MBTL2), субъединицы 4 snRNA-активирующего белкового комплекса (SNAPC4), лизин-специфической деметилазы 5 (KDM5), фактора транскрипции COE1 (EBF1), белка forkhead box J2 (FOXP2), ядерного фактора активированных Т-клеток, цитоплазматического 1 (NFATC1), белка-активатора распада мРНК ZFP36 (ZFP36), происходящего из гепатомы фактора роста (HDGF), ETS-связанного фактора транскрипции Elf-1 (ELF1), белка промиелоцитарного лейкоза (PML), Myb-связанного белка В MYBL2, матери против декапентегического гомолога 2 (SMAD2), хромодомен-ДНК-хеликаза-связывающего белка 2 (CHD2), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1), белка paired box Pax-5 (PAX5), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 2 (STAT2), гомолога rugopus 2 (PYGO2), регуляторного фактора интерферона 9 (IRF9), белка 2 кольцевого пальца группы polycomb (PCGF2) и циклический AMP-зависимого фактора транскрипции ATF-3 (ATF3).

[00167] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер включает один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из субъединицы альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокинового (C-C мотив) лиганда 2 (CCL2) и SLIT-ROBO Rho GTPаза-активирующего белка 1 (SRGAP1).

[00168] Согласно определенным аспектам биомаркер включает маркер Т-

клеточной активации. Активация Т-клеток может способствовать цитотоксическому уничтожению гематологических злокачественных опухолевых клеток и, следовательно, может быть полезна при лечении гематологической злокачественной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления Т-клеточная активация включает цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией. Согласно конкретным вариантам осуществления цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией, содержит интерлейкин 2 (IL-2). Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер Т-клеточной активации, и биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень маркера Т-клеточной активации после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более высокий уровень IL-2 в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть выше контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более низкий уровень биомаркера является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00169] Согласно другим вариантам осуществления, биомаркер представляет собой маркер истощения Т-клеток. Истощенные Т-клетки фенотипически отличаются от функциональных эффекторных Т-клеток, поскольку они приобретают экспрессию ингибирующих сигнальных путей, включая белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD1) и белок 3 гена активации лимфоцитов (LAG3). Истощенные Т-клетки демонстрируют сниженную дифференцировку, пролиферацию и сниженную продукцию эффекторных цитокинов/хемокинов (например, GM-CSF, TNF α и IFN γ). Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер включает PD1, LAG3 или их комбинацию. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер включает гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактора некроза опухоли альфа

(TNF α), интерферон-гамма (IFN γ) или их комбинацию.

[00170] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер истощения Т-клеток и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень маркера истощения Т-клеток по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера перед введением соединения, и более низкий уровень PD1, LAG3 или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть ниже контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более высокий уровень GM-CSF, TNF α , IFN γ или их комбинации в образце после введения по сравнению с контрольным уровнем является показателем эффективности лечения.

[00171] Согласно некоторым аспектам биомаркер представляет собой маркер цитотоксичности в нераковых клетках. Нейтрофилы представляют собой первую линию защиты от инфекции в качестве первого клеточного компонента воспалительной реакции и ключевого компонента врожденного иммунитета. Нейтропения притупляет воспалительную реакцию на зарождающиеся инфекции, что способствует размножению и инвазии бактерий. Осложнения нейтропении остаются основной ограничивающей дозу токсичностью лечения рака химиотерапевтическим средством и связаны со значительной заболеваемостью и смертностью. Таким образом, созревание нейтрофилов *ex vivo* может быть полезным при лечении гематологической злокачественной опухоли, а также для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью. Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой экспрессию Ikaros в нейтрофилах. Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер экспрессируется в белых кровяных тельцах. Согласно конкретным вариантам осуществления белое кровяное тельце содержит миелоидную клетку. Согласно другим вариантам осуществления миелоидная клетка содержит нейтрофил. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер содержит нейтрофилы,

имеющие фенотип CD11b⁺, CD34⁺ и CD33⁺.

[00172] Согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер представляет собой маркер цитотоксичности в нераковых клетках, и биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Например, согласно определенным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более низкий уровень маркера цитотоксичности в нейтрофилах является информативным для установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно конкретным вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более низкий уровень Ikaros и/или нейтрофилов, имеющих фенотип CD11b⁺, CD34⁺ и CD33⁺, является информативным для снижения количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Однако понятно, что биомаркер в образце необязательно должен быть ниже контрольного уровня биомаркера. Поэтому, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Например, согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень представляет собой уровень биомаркера после первого введения биомаркера, и более высокий уровень Ikaros и/или нейтрофилов, имеющих фенотип CD11b⁺, CD34⁺ и CD33⁺, является информативным для повышения количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Согласно одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00173] Для сравнения испытуемого образца можно использовать различные контрольные образцы. В качестве примера, неограничивающими типами контрольного образца могут быть, например, необработанный образец, обработанный образец более раннего момента времени в ходе схемы лечения, стандартизированный контрольный образец или любой другой образец, пригодный для сравнения. Согласно некоторым вариантам осуществления контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у субъекта перед введением соединения для лечения субъекту, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец. Согласно другим вариантам осуществления контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у здорового субъекта, не страдающего гематологической злокачественной опухолью, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец. Согласно другим

вариантам осуществления контрольный уровень биомаркера представляет собой заранее определенный уровень биомаркера.

[00174] Специалисту в данной области техники понятно, что измененные уровни биомаркеров будут иметь различную интерпретацию в зависимости от конкретного биомаркера, а также контрольного образца, используемого для сравнения. Например, уровень биомаркера, например, апоптотического маркера после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, может быть выше контрольного образца, который взят у субъекта до введения какого-либо соединения для лечения субъекту. Повышенный уровень биомаркера может указывать на то, что лечение является эффективным. Альтернативно, уровень биомаркера, например, CRBN-ассоциированного белка после лечения соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, может быть ниже контрольного образца, который взят у субъекта до введения какого-либо соединения для лечения субъекту. Пониженный уровень биомаркера в таких обстоятельствах может свидетельствовать об эффективности лечения.

[00175] Однако один и тот же биомаркер может иметь разный уровень в одном и том же образце при сравнении его с другим контрольным образцом. Например, уровень биомаркера, например, CRBN-ассоциированного белка, может быть выше, чем в контрольном образце, полученном у того же субъекта, но когда контрольный образец был получен в более ранний момент времени схемы лечения, и по-прежнему указывает на эффективность лечения, поскольку уровень биомаркера все еще ниже, чем в контрольном образце, взятом у субъекта до введения субъекту любого соединения для лечения. Соответственно, уровень биомаркера и значение уровня биомаркера будут зависеть от контекста контрольного образца.

[00176] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления обнаружение биомаркера может указывать на то, что субъект отвечает. Согласно определенным вариантам осуществления повышенный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта. Согласно другим вариантам осуществления пониженный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта. Согласно

одному варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой DLBCL. Согласно другому варианту осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL.

[00177] Обнаружение биомаркеров находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Например, согласно определенным вариантам осуществления определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня белка биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня мРНК биомаркера. Согласно другим вариантам осуществления определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня кДНК биомаркера в качестве суррогатного маркера для определения уровня РНК. Типичные анализы, представленные в настоящем документе для способов обнаружения и количественного определения уровня белка биомаркера, такого как Aiolos, Ikaros, CRBN, c-MYC, IRF4, ZFP91, BCL2, BCL6, MCL1, IRF7, IFIT3, расщепляющая каспаза-3, расщепляющая каспаза-7, расщепленная PARP, BIM, DDX58, сурвивин, PD1, LAG3, цитокины, ассоциированные с Т-клеточной активацией, или их комбинации, представляют собой иммуноанализы, такие как вестерн-блоттинг, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) (например, сэндвич-вариант ELISA), иммуногистохимия (ИHC) и сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Иллюстративные анализы, раскрытые в настоящем документе, для способов обнаружения и количественного определения уровня РНК биомаркера, такого как Aiolos, Ikaros, ZFP91, CRBN, c-MYC, IRF4, цитокины, ассоциированные с Т-клеточной активацией, CD142 (тканевой фактор), CD62E (Е-селектин), интерлейкин-8 (IL8), интерлейкин-2 (IL2), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-17A (IL17A), интерлейкин-17F (IL17F), коллаген-I, коллаген-III, PAI-I, интерлейкин-10 (IL-10), CD69, иммуноглобулин (IgG), фактор некроза опухоли альфа (TNF α) или их комбинации, представляют собой полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), например, количественную ОТ-ПЦР (qRT-PCR) и RNA-Seq.

[00178] Понятно, что способы, описанные выше для обнаружения биомаркеров, не являются ограничивающими, и что специалист в данной области техники может использовать любой из известных способов для обнаружения и измерения биомаркеров, раскрытых в настоящем документе. Соответственно, при осуществлении в практическом применении вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, будут использоваться, если не указано иное, общепринятые 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*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001), Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999), Glover, ed., *DNA Cloning*, Volumes I and II (1985), Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1987, 51:263-273, *PCR Technology* (Stockton Press, NY, Erlich, ed., 1989), Gait, ed., *Oligonucleotide Synthesis* (1984), Hames & Higgins, eds., *Nucleic Acid Hybridization* (1984), Hames & Higgins, eds., *Transcription and Translation* (1984), Freshney, ed., *Animal Cell Culture: Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London), Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer Verlag, N.Y., 2d ed. 1987), и Weir & Blackwell, eds., *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (1986).

5.4 Способы лечения и/или контроля

[00179] Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или контроля гематологической злокачественной опухоли, предусматривающим введение терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

[00180] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу селективного лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который предусматривает (a) взятие образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, (b) определение уровня биомаркера в образце, (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или (ii) уровень биомаркера представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, и (d) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, диагностированному как вероятно отвечающий на соединение для лечения, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли,

или $2-(2,6\text{-диоксопиперидин-3-ил})-4-((2\text{-фтор-4-}((3\text{-морфолиноазетидин-1-ил})\text{метил})\text{бензил})\text{амино})\text{изоиндолин-1,3-диона}$ (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой $(S)\text{-}2-(2,6\text{-диоксопиперидин-3-ил})-4-((2\text{-фтор-4-}((3\text{-морфолиноазетидин-1-ил})\text{метил})\text{бензил})\text{амино})\text{изоиндолин-1,3-дион}$ (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00181] Настоящее изобретение также относится к способу лечения гематологической злокачественной опухоли, который предусматривает (a) получение первого образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, (b) определение уровня биомаркера в первом образце, (c) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, (d) получение по меньшей мере одного дополнительного образца у субъекта после лечения, и (e) определение уровня биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце, и если уровень биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце находится при или около уровня биомаркера первого образца, тогда введение другого терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из $(S)\text{-}2-(2,6\text{-диоксопиперидин-3-ил})-4-((2\text{-фтор-4-}((3\text{-морфолиноазетидин-1-ил})\text{метил})\text{бензил})\text{амино})\text{изоиндолин-1,3-диона}$ (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, $(R)\text{-}2-(2,6\text{-диоксопиперидин-3-ил})-4-((2\text{-фтор-4-}((3\text{-морфолиноазетидин-1-ил})\text{метил})\text{бензил})\text{амино})\text{изоиндолин-1,3-диона}$ (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или $2-(2,6\text{-диоксопиперидин-3-ил})-4-((2\text{-фтор-4-}((3\text{-морфолиноазетидин-1-ил})\text{метил})\text{бензил})\text{амино})\text{изоиндолин-1,3-диона}$ (Соединение 3) или его энантиомера, смеси

энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00182] Кроме того, настоящее изобретение относится к способу контроля эффективности соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, который предусматривает: (a) введение соединения для лечения субъекту, (b) взятие образца у субъекта, (c) определение уровня биомаркера в образце, и (d) сравнение уровня биомаркера в образце с контрольным уровнем биомаркера, где измененный уровень биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I), или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль

содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00183] Настоящее изобретение также относится к способу идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения предусматривает (a) взятие образца у субъекта, (b) введение соединения для лечения в образец, (c) определение уровня биомаркера в образце, и (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль

содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00184] Согласно другим вариантам осуществления способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения предусматривает (a) введение соединения для лечения субъекту, (b) взятие образца у субъекта, (c) определение уровня биомаркера в образце, и (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит

неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00185] Согласно другим вариантам осуществления способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения предусматривает (a) взятие образца у субъекта, (b) определение уровня биомаркера в образце, (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или (ii) уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, и где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой DLBCL. Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная

опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00186] Как описано в разделе 5.3, различные биомаркеры можно применять в способах, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления обнаружение или измененный уровень биомаркеров, раскрытых в настоящем документе, можно применять в способах для идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно должен отвечать на соединение для лечения. Например, обнаружение, например, CRBN, может указывать, что субъект, страдающий гематологической злокачественной опухолью, вероятно должен быть отвечающим. Другой иллюстративный биомаркер, такой как, например, CRBN-ассоциированный белок (например, IKAROS, AIOLOS, ZFP91) может снижаться по сравнению с необработанным образцом в ответ на лечение соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, и применяться, например, в способе идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения. Согласно другим вариантам осуществления, обнаружение или измененный уровень биомаркеров, раскрытых в настоящем документе, можно применять, например, в способах лечения гематологической злокачественной опухоли или контроля эффективности соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью. Например, соединение для лечения формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль можно вводить субъекту, и уровень биомаркера в образце у субъекта, подвергнутого лечению, можно сравнить с контрольным образцом, взятым у того же субъекта перед каким-либо лечением. Повышение уровня биомаркера, например, апоптотического белка, может указывать на то, что лечение является эффективным и направлять практикующего врача при лечении субъекта. Понятно, что примеры, описанные выше, являются иллюстративными и не включают биомаркеры, которые можно применять со способами, раскрытыми в настоящем документе.

5.5 Способы установления количества или частоты введения доз

[00187] Настоящее изобретение также относится к способу установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего

гематологической злокачественной опухолью, соединением для лечения, который предусматривает: (а) введение дозы соединения для лечения субъекту, (b) взятие одного или нескольких образцов у субъекта в различные моменты времени и (с) контроль уровня биомаркера в одном или нескольких образцах, и (d) установление дозы для последующего введения соединения для лечения на основе измененного уровня биомаркера в контрольном образце, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно определенным вариантам осуществления схему проведения цикла определяют на основе обнаружения уровня биомаркера. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение формулы (I) содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2) или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли или 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. Согласно определенным вариантам осуществления соединение для лечения формулы (I) представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (Соединение 1) или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому. Согласно конкретным вариантам осуществления неходжкинская лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Согласно другим вариантам осуществления DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии. Согласно другим вариантам осуществления, гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL/SLL. Согласно другим вариантам осуществления CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

[00188] Можно использовать различные биомаркеры для того, чтобы определить нуждается ли в корректировке количество или частота введения дозы для лечения. Согласно определенным вариантам осуществления биомаркер, используемый в способе установления количества или частоты введения доз, может быть выбран из группы, состоящей из зрелых нейтрофилов и уровней белка Ikaros в нейтрофилах. Например,

созревание нейтрофилов *ex vivo* можно использовать в качестве биомаркера для оценки, например, миелоидной токсичности. Согласно определенным вариантам осуществления *ex vivo* культуры CD34⁺ клеток костного мозга могут быть подвергнуты воздействию различных схем обработки соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, и может быть индуцирована миелоидная дифференцировка, например, с использованием фактора стволовых клеток (SCF), лиганда тирозинкиназы 3, связанного с FMS (FLT3-L), и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) в культуральной среде. Дифференцировку клеток в присутствии или в отсутствие соединения формулы (I) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли можно оценить в заданные моменты времени в различных популяциях клеток (например, гемопоэтических стволовых клетках (HSC, CD34⁺/CD33⁻/CD11b⁻), клетках стадии I (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁻), клетках стадии II (CD134⁻/CD33⁺/CD11b⁻), клетках стадии III (CD34⁻/CD33⁺/CD11b⁺) и клетках стадии IV (CD34⁻/CD33⁻/CD11b⁺)). Согласно определенным вариантам осуществления восстановление зрелых нейтрофилов (клетки стадии IV) после воздействия соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, может служить биомаркером.

[00189] Согласно другим вариантам осуществления уровни белка Ikaros в нейтрофилах могут быть биомаркерами для определения схемы введения доз и/или цитотоксичности. Как раскрыто в настоящем документе, было обнаружено, что уровни Ikaros снижаются в нейтрофилах в ходе воздействия соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, и восстанавливаются после отмены лекарственного средства зависимым от концентрации образом. Полному восстановлению созревания нейтрофилов поздних стадий непосредственно предшествовало восстановление уровня Ikaros. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления разрушение Ikaros и/или восстановление Ikaros в нейтрофилах может быть биомаркером ответа на соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, а также биомаркером цитотоксичности. Кроме того, уровни белка Ikaros в нейтрофилах и/или созревание нейтрофилов могут быть биомаркерами для определения схемы проведения цикла. Например, восстановление уровня белка Ikaros после введения соединения формулы (I) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли до по меньшей мере приблизительно 30% или более, приблизительно 40% или более,

приблизительно 50% или более, приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более может быть использовано в качестве биомаркера перед последующим введением соединения формулы (I) или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

[00190] Должно быть понятно, что биомаркеры, описанные выше для применения в способе установления количества и частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, соединением для лечения, не являются ограничивающими, и что другие биомаркеры, которые указывают на количество, стадию и/или жизнеспособность зрелых нейтрофилов, могут быть полезны в качестве биомаркеров.

5.6 Фармацевтические композиции и пути введения

[00191] Как раскрыто в настоящем документе, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси, такие как любое из соединений, описанных в разделе 5.2, можно вводить субъекту перорально, местно или парентерально в обычной форме препаратов, такой как капсулы, микрокапсулы, таблетки, гранулы, порошок, пастилки, пилюли, суппозитории, инъекции, суспензии, сиропы, пластыри, кремы, лосьоны, мази, гели, спреи, растворы и эмульсии. Подходящие составы могут быть получены способами, обычно используемыми с использованием обычных органических или неорганических добавок, таких как вспомогательное вещество (например, сахароза, крахмал, маннит, сорбит, лактоза, глюкоза, целлюлоза, тальк, фосфат кальция или карбонат кальция), связующее (например, целлюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, полипропилпирролидон, поливинилпирролидон, желатин, гуммиарабик, полиэтиленгликоль, сахароза или крахмал), разрыхлитель (например, крахмал, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилкрахмал, низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза, бикарбонат натрия, фосфат кальция или цитрат кальция), смазывающее вещество (например, стеарат магния, легкая безводная кремниевая кислота, тальк или лаурилсульфат натрия), ароматизатор (например, лимонная кислота, ментол, глицин или апельсиновый порошок), консервант (например, бензоат натрия, бисульфит натрия, метилпарабен или пропилпарабен), стабилизатор (например, лимонная кислота, цитрат натрия или уксусная кислота), суспендирующий агент (например, метилцеллюлоза, поливинилпирроликлон или стеарат алюминия), диспергирующее вещество (например, гидроксипропилметилцеллюлоза), разбавитель (например, вода) и базовый воск (например, масло какао, белый вазелин или полиэтиленгликоль). Эффективное количество соединений

в фармацевтической композиции может быть на уровне, обеспечивающем желаемый эффект, от приблизительно 0,001 мг/кг массы тела субъекта до приблизительно 1 мг/кг массы тела субъекта в стандартной дозе как для перорального, так и для парентерального введения.

[00192] Соединение, раскрытое в настоящем документе, можно вводить перорально. Согласно одному варианту осуществления при пероральном введении соединение, раскрытое в настоящем документе, вводят с пищей и водой. Согласно другому варианту осуществления соединение, раскрытое в настоящем документе, диспергируют в воде или соке (например, яблочном соке или апельсиновом соке) и вводят перорально в виде раствора или суспензии.

[00193] Соединение, раскрытое в настоящем документе, также можно вводить внутрикожно, внутримышечно, внутривенно, интравенно, подкожно, интраназально, эпидурально, сублингвально, интрацеребрально, интравагинально, трансдермально, ректально, через слизистую оболочку, путем ингаляции или местно в уши, нос, глаза или на кожу. Способ введения остается на усмотрение практикующего врача и может частично зависеть от локализации медицинского состояния.

[00194] Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к капсулам, содержащим соединение, раскрытое в настоящем документе, без дополнительного носителя, вспомогательного вещества или среды. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим эффективное количество соединения, раскрытого в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель или среду, где фармацевтически приемлемый носитель или среда может содержать вспомогательное вещество, разбавитель или их смесь. Согласно одному варианту осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

[00195] Композиции могут быть в форме таблеток, жевательных таблеток, капсул, растворов, растворов для парентерального введения, пастилок, суппозиторий и суспензий и т.п. Композиции могут быть составлены таким образом, чтобы содержать дневную дозу или удобную часть дневной дозы в дозированной единице, которая может представлять собой одну таблетку или капсулу или удобный объем жидкости. Согласно одному варианту осуществления растворы готовят из водорастворимых солей. Как правило, все композиции готовят согласно известным в фармацевтической химии способам. Капсулы могут быть получены путем смешивания соединения, раскрытого в настоящем документе, с подходящим носителем или разбавителем и заполнения капсул необходимым количеством смеси. Обычные носители и разбавители включают без ограничения инертные

порошкообразные вещества, такие как крахмал многих различных видов, порошкообразная целлюлоза, особенно кристаллическая и микрокристаллическая целлюлоза, сахара, такие как фруктоза, маннит и сахароза, зерновая мука и подобные пищевые порошки.

[00196] Таблетки можно получить прямым прессованием, влажной грануляцией или сухой грануляцией. Их составы обычно включают разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества и разрыхлители, а также соединение. Типичные разбавители включают, например, различные виды крахмала, лактозу, маннит, каолин, фосфат или сульфат кальция, неорганические соли, такие как хлорид натрия и порошкообразный сахар. Также пригодны порошкообразные производные целлюлозы. Иллюстративными связующими для таблеток являются такие вещества, как крахмал, желатин и сахара, такие как лактоза, фруктоза, глюкоза и т.п. Пригодны также природные и синтетические камеди, включая арабийскую камедь, альгинаты, метилцеллюлозу, поливинилпирролидин и тому подобное. Полиэтиленгликоль, этилцеллюлоза и воски также могут служить связующими.

[00197] Смазывающее вещество может быть необходимо в составе таблеток для того, чтобы предотвратить прилипание таблетки и штампов к форме. Смазывающее вещество может быть выбрано из таких скользких твердых веществ, как тальк, стеарат магния и кальция, стеариновая кислота и гидрогенизированные растительные масла. Разрыхлители таблеток представляют собой вещества, которые набухают при намокании, разрушая таблетку и высвобождая соединение. Они включают крахмалы, глины, целлюлозы, альгины и камеди. В частности, можно использовать кукурузный и картофельный крахмалы, метилцеллюлозу, агар, бентонит, древесную целлюлозу, порошкообразную натуральную губку, катионообменные смолы, альгиновую кислоту, гуаровую камедь, мякоть цитрусовых и карбоксиметилцеллюлозу, например, а также лаурилсульфат натрия. Таблетки могут быть покрыты сахаром в качестве ароматизатора и герметика или пленкообразующими защитными агентами для изменения свойств растворения таблетки. Композиции также могут быть получены в виде жевательных таблеток, например, с использованием в составе таких веществ как маннит.

[00198] Когда желательно вводить соединение, раскрытое в настоящем документе, в виде суппозитория, можно использовать типичные основы. Какао-масло представляет собой традиционную основу для суппозитория, которую можно модифицировать путем добавления восков, чтобы немного повысить ее температуру плавления. Смешиваемые с водой суппозиторные основы, включающие, в частности, полиэтиленгликоли различной молекулярной массы, находят широкое применение.

[00199] Эффект соединения, раскрытого в настоящем документе, можно

отсрочить или продлить посредством соответствующего состава. Например, медленно растворимая гранула соединения, раскрытого в настоящем документе, может быть получена и включена в таблетку или капсулу или получена в виде имплантируемого устройства с медленным высвобождением. Этот способ также предусматривает получение гранул с несколькими различными скоростями растворения и заполнение капсул смесью гранул. Таблетки или капсулы могут быть покрыты пленкой, препятствующей растворению в течение заданного периода времени. Даже парентеральные препараты можно получить с пролонгированным действием путем растворения или суспендирования соединения, раскрытого в настоящем документе, в масляных или эмульгированных носителях, которые позволяют ему медленно диспергироваться в сыворотке.

[00200] Способы, раскрытые в настоящем документе, охватывают лечение пациента независимо от его возраста. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту исполнилось 18 лет или более. Согласно другим вариантам осуществления субъекту более 18, 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 70 лет. Согласно другим вариантам осуществления субъекту менее 65 лет. Согласно другим вариантам осуществления субъекту более 65 лет.

[00201] В зависимости от состояния подлежащего лечению заболевания и состояния субъекта Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, можно вводить посредством перорального, парентерального (например, внутримышечная, внутривенная, CIV, внутрицистальная инъекция или инфузия, подкожная инъекция или имплантат), ингаляционного, назального, вагинального, ректального, подъязычного или местного (например, трансдермального или локального) пути введения. Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль могут быть составлены отдельно или вместе в подходящей дозированной единице с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, носителями, адъювантами и средами, соответствующими для каждого пути введения.

[00202] Согласно одному варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят перорально. Согласно другому варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят парентерально.

Согласно другому варианту осуществления соединения Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят внутривенно.

[00203] Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль, могут быть доставлены в виде однократной дозы, такой как, например, однократная болюсная инъекция или пероральные капсулы, таблетки или пилюли, или с течением времени, как например, непрерывная инфузия с течением времени или разделенные болюсные дозы с течением времени. Соединения, описанные в настоящем документе, можно вводить повторно, если это необходимо, например, до тех пор, пока у пациента не возникнет стабилизация заболевания или регрессия, или пока у пациента не возникнет прогрессирование заболевания или неприемлемая токсичность.

[00204] Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, можно вводить один раз в день (QD) или разделять на несколько дневных доз, как например, 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, такое как Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытое в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят один или более чем один раз в день, например, в течение определенного периода времени. Термин «непрерывно» означает, что терапевтическое соединение, такое как Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытое в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят ежедневно в течение непрерывного периода в течение по меньшей мере от 7 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 Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3, раскрытых в настоящем документе, или их энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, представляет собой введение от одного до шести дней в неделю, введение циклами (например, ежедневное введение в течение от двух до восьми последовательных недель, затем период отдыха без введения до

одной недели) или введение через день. В контексте настоящего изобретения термин «проведение цикла» означает, что терапевтическое соединение, такое как Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытое в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят ежедневно или непрерывно, но с периодом отдыха.

[00205] Согласно некоторым вариантам осуществления частота введения находится в диапазоне от приблизительно дневной дозы до приблизительно месячной дозы. Согласно одному варианту осуществления введение осуществляют 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 каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели. Согласно одному варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль, вводят один раз в день. Согласно другому варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят два раза в день. Согласно другому варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят три раза в день. Согласно другому варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, раскрытые в настоящем документе, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят четыре раза в день.

[00206] Согласно одному варианту осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение терапевтически эффективного количества Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3 за один или несколько 7-ми дневных циклов лечения. Согласно другому варианту осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение терапевтически эффективного количества Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3 на дни 1 - 5 7-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3 вводят один раз ежедневно в течение 5 дней с последующими 2 днями отдыха. Согласно другому варианту осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение терапевтически эффективного количества Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3 на дни 1 - 5, дни 8 - 12, дни 15 - 19 и дни 22 - 26 28-ми дневного цикла.

[00207] Согласно одному варианту осуществления гематологическая

злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоидный лейкоз (CLL), и лечение предусматривает введение терапевтически эффективного количества второго активного агента за один или несколько циклов лечения. Согласно одному варианту осуществления второй активный агент вводят дважды каждые 7 дней. Согласно одному варианту осуществления второй активный агент вводят один раз каждую неделю. Согласно одному варианту осуществления второй активный агент вводят один раз каждые 4 недели. Согласно одному варианту осуществления второй активный агент вводят на дни 1, 2, 8 и 15 первого 28-ми дневного цикла и вводят на день 1 от второго до шестого 28-ми дневного цикла.

[00208] Любой цикл лечения, описанный в настоящем документе, можно повторять в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более циклов. В некоторых случаях описанный в настоящем документе цикл лечения включает от 1 до приблизительно 24 циклов, от приблизительно 2 до приблизительно 16 циклов или от приблизительно 2 до приблизительно 4 циклов. В некоторых случаях описанный в настоящем документе цикл лечения включает от 1 до приблизительно 4 циклов. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество Соединения 1, Соединение 2 или Соединение 3 и/или второго активного агента вводят в течение от 1 до 24 циклов по 28 дней (например, приблизительно 2 года). В некоторых случаях проведение циклов лечения не ограничено количеством циклов, а лечение продолжается до прекращения прогрессирования заболевания. В некоторых случаях циклы могут предусматривать изменение продолжительности периодов введения и/или периодов отдыха, описанных в настоящем документе.

5.7 Вторые активные агенты

[00209] Соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль можно комбинировать с другими фармакологически активными соединениями («вторыми активными агентами») в способах и композициях, раскрытых в настоящем документе. Определенные комбинации могут работать синергетически при лечении конкретных типов заболеваний или нарушений, а также состояний и симптомов, связанных с такими заболеваниями или нарушениями. Соединение формулы (I) или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль также могут облегчать побочные эффекты, связанные с некоторыми вторыми активными агентами, и наоборот.

[00210] В раскрытых в настоящем документе способах и композициях можно

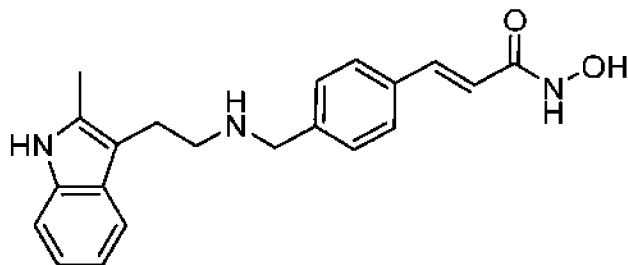
использовать один или несколько вторых активных ингредиентов или агентов. Вторыми активными агентами могут быть большие молекулы (например, белки) или малые молекулы (например, синтетические неорганические, металлоорганические или органические молекулы). Можно использовать различные агенты, такие как описанные в заявке на патент США № 16/390815 или в предварительной заявке на патент США, озаглавленной "SUBSTITUTED 4-AMINOISOINDOLINE-1,3-DIONE COMPOUNDS AND SECOND ACTIVE AGENTS FOR COMBINED USE," с такой же датой подачи, что и настоящая заявка (номер патентного реестра 14247-390-888), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные вторые активные агенты включают без ограничения ингибитор HDAC (например, панобиностат, ромидеписин, вориностат или цитариностат), ингибитор BCL2 (например, венетоклакс), ингибитор BTK (например, ибрутиниб или акалабрутиниб), ингибитор mTOR (например, эверолимус), ингибитор PI3K (например, иделалисиб), ингибитор PKC β (например, энзастаурин), ингибитор SYK (например, фостаматиниб), ингибитор JAK2 γ (например, федраитниб, пакритиниб, руксолитиниб, барицитиниб, гандотиниб, лестауртиниб или момелотиниб), ингибитор киназы Aurora A (например, алисертиб), ингибитор EZH2 (например, таземетостат, GSK126, CPI-1205, 3-деазанепланоцин A, EPZ005687, EI1, UNC1999 или синефунгин), ингибитор BET (например, бирабресиби или 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он), гипометилирующий агент (например, 5-азациитидин или децитабин), химиотерапевтическое средство (например, бендамустин, доксорубицин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, ифосфамид, мелфалан, оксалиплатин или дексаметазон) или эпигенетическое соединение (например, ингибитор DOT1L, такой как пинометостат, ингибитор HAT, такой как C646, ингибитор WDR5, такой как OICR-9429, селективный ингибитор DNMT1, такой как GSK3484862, ингибитор LSD-1, такой как Соединение С или секлидемстат, ингибитор G9A, такой как UNC0631, ингибитор PRMT5, такой как GSK3326595, ингибитор BRD (например, ингибитор BRD9/7, такой как LP99), ингибитор SUV420H1/H2, такой как A-196, или ингибитор CARM1, такой как EZM2302).

[00211] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, способы дополнительно предусматривают введение одного или нескольких из ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина, винкристина, преднизона, этопозиды, бендамустина (Treanda), леналидомида или гемцитабина. Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, лечение дополнительно предусматривает лечение одним или несколькими трансплантатами стволовых клеток, бендамустином (Treanda) плюс ритуксимаб, ритуксимабом,

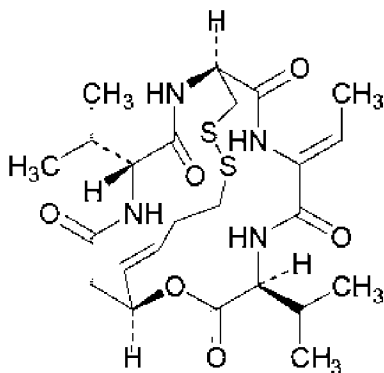
леналидомидом плюс ритуксимаб или комбинациями на основе гемцитабина. Согласно определенным вариантам осуществления второй активный агент представляет собой ритуксимаб, как раскрыто в предварительной заявке на патент США № 62/833432.

[00212] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор гистондеацетилазы (HDAC). Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой панобиностат, ромидепсин, вориностат или цитариностат или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

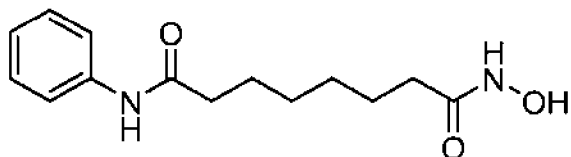
[00213] Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой панобиностат или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой панобиностат. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой фармацевтически приемлемую соль панобиностата. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой панобиностат лактат. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой монолактатную соль панобиностата. Панобиностат имеет химическое название (2E)-N-гидрокси-3-[4-({[2-(2-метил-1H-индол-3-ил)этил]амино}метил)фенил]акриламид и имеет структуру:



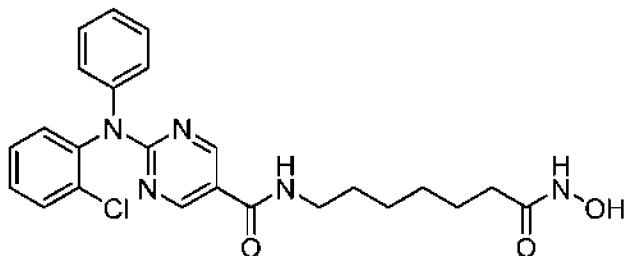
[00214] Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой ромидепсин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой ромидепсин. Ромидепсин имеет химическое название (1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-этилиден-4,21-бис(1-метилэтил)-2-окса-12,13-дитиа-5,8,20,23-тетраазабицикло[8.7.6]трикос-16-ен-3,6,9,19,22-пентон и имеет структуру:



[00215] Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой вориностат или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой вориностат. Вориностат имеет химическое название *N*-гидрокси-*N'*-фенилоктандиамид и имеет структуру:

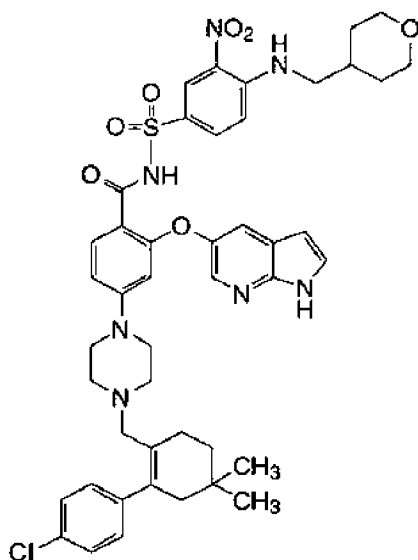


[00216] Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC представляет собой ингибитор HDAC6. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC6 представляет собой цитариностат или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор HDAC6 представляет собой цитариностат. Цитариностат (также известный как ACY-241) имеет химическое название 2-((2-хлорфенил)(фенил)амино)-N-(7-(гидроксиамино)-7-оксогептил)пиримидин-5-карбоксамид и имеет структуру:



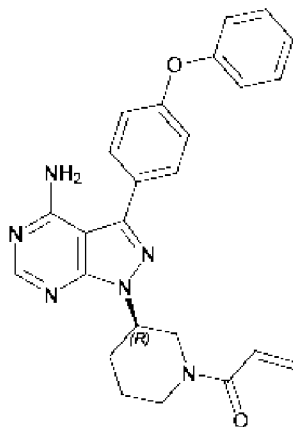
[00217] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор В-клеточной лимфомы 2 (BCL2). Согласно одному варианту осуществления ингибитор BCL2 представляет собой венетоклакс или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор

BCL2 представляет собой венетоклакс. Венетоклакс имеет химическое название 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-*N*-(3-нитро-4-[(тетрагидро-2*H*-пиран-4илметил)амино]фенил)сульфонил)-2-(1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридин-5-илокси)бензамид) и имеет структуру:

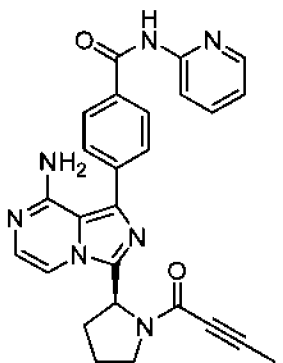


[00218] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК). Согласно одному варианту осуществления ингибитор ВТК представляет собой ибрутиниб или акалабрутиниб или их стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

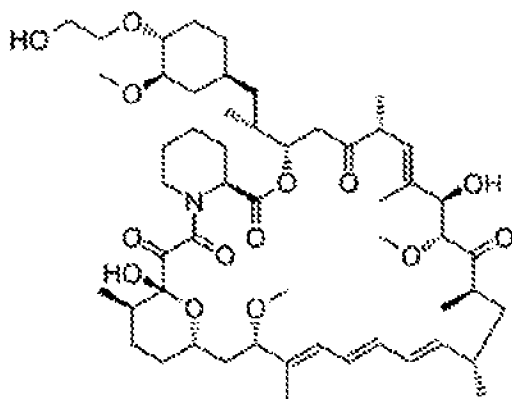
[00219] Согласно одному варианту осуществления ингибитор ВТК представляет собой ибрутиниб или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор ВТК представляет собой ибрутиниб. Ибрутиниб имеет химическое название 1-[(3*R*)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1*H*-пироло[3,4-*d*]пиримидин-1-ил]-1-пиперидинил]-2-пропен-1-он и имеет структуру:



[00220] Согласно одному варианту осуществления ингибитор ВТК представляет собой акалабрутиниб или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор ВТК представляет собой акалабрутиниб. Акалабрутиниб имеет химическое название (S)-4-(8-амино-3-(1-(бут-2-иноил)пирролидин-2-ил)имидазо[1,5-a]пиразин-1-ил)-N-(пиридин-2-ил)бензамид и имеет структуру:

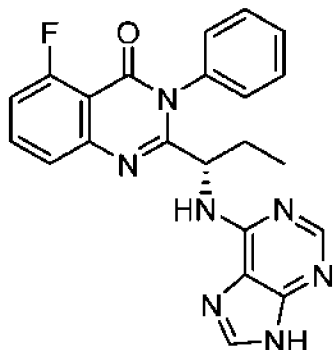


[00221] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор мишени рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR). Согласно одному варианту осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин или его аналог (также называемый рапалог). Согласно одному варианту осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. Эверолимус имеет химическое название 40-O-(2-гидроксиэтил)-рапамицин и имеет структуру:

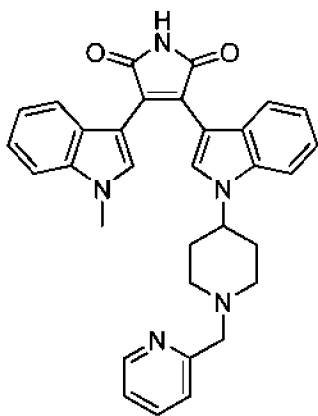


[00222] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Согласно одному варианту осуществления ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб или его стереоизомер, смесь

стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор Р13К представляет собой иделалисиб. Иделалисиб имеет химическое название 5-фтор-3-фенил-2-[(1S)-1-(9H-пурин-6-иламино)пропил]хиназолин-4(3H)-он и имеет структуру:

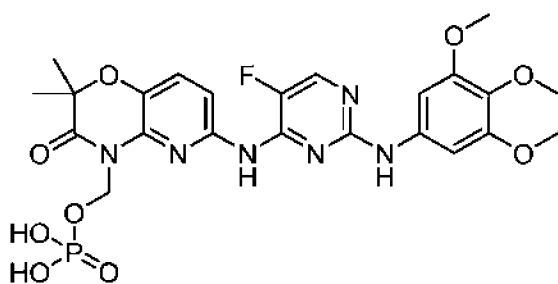


[00223] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор протеинкиназы С-бета (PKC β или PKC- β). Согласно одному варианту осуществления ингибитор PKC β представляет собой энзастаурин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PKC β представляет собой энзастаурин. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PKC β представляет собой фармацевтически приемлемую соль энзастаурина. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PKC β представляет собой гидрохлоридную соль энзастаурина. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PKC β представляет собой бисгидрохлоридную соль энзастаурина. Энзастаурин имеет химическое название 3-(1-метилиндол-3-ил)-4-[1-[1-(пуридин-2-илметил)пиперидин-4-ил]индол-3-ил]пиррол-2,5-дион и имеет структуру:



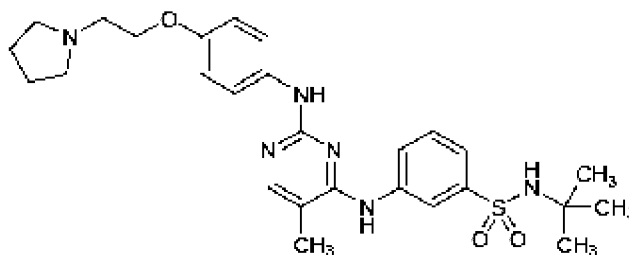
[00224] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор тирозинкиназы селезенки (SYK). Согласно одному варианту осуществления

ингибитор SYK представляет собой фостаматиниб или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор SYK представляет собой фостаматиниб. Согласно одному варианту осуществления ингибитор SYK представляет собой фармацевтически приемлемую соль фостаматиниба. Согласно одному варианту осуществления ингибитор SYK представляет собой фостаматиниб динатрия гексагидрат. Фостаматиниб имеет химическое название (6-((5-фтор-2-((3,4,5-триметоксифенил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-2,2-диметил-3-оксо-2,3-дигидро-4Н-пиридо[3,2- b][1,4]оксазин-4-ил)метил дигидрофосфат и имеет структуру:



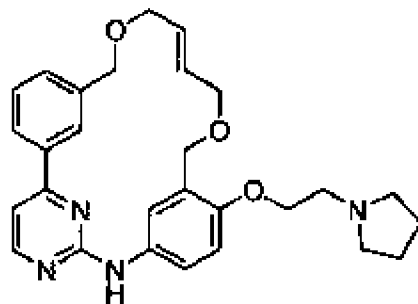
[00225] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор Янус-киназы 2 (JAK2). Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой федраитниб, пакритиниб, руксолитиниб, барицитиниб, гандотиниб, лестауртиниб или момелотиниб или их стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[00226] Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой федраитниб или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой федраитниб. Федраитниб имеет химическое название N-трет-бутил-3-[(5-метил-2-{4-[2-(пирролидин-1-ил)этокси]анилино}пиримидин-4-ил)амино]бензолсульфонамид и имеет структуру:

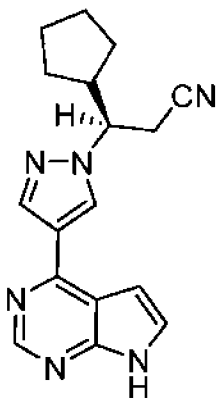


[00227] Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой пакритиниб или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2

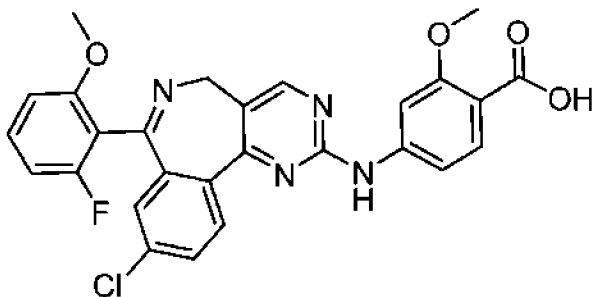
представляет собой пакритиниб. Пакритиниб имеет структуру:



[00228] Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой руксолитиниб или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой руксолитиниб. Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой фармацевтически приемлемую соль руксолитиниба. Согласно одному варианту осуществления ингибитор JAK2 представляет собой руксолитиниб фосфат. Руксолитиниб имеет химическое название (*R*)-3-(4-(7*H*-пирроло[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-1*H*-пиразол-1-ил)-3-циклопентилпропаннитрил и имеет структуру:

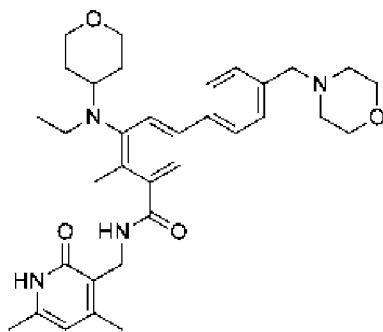


[00229] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор киназы аутога А. Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы аутога А представляет собой алисертиб или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор киназы аутога А представляет собой алисертиб. Алисертиб имеет химическое название 4-((9-хлор-7-(2-фтор-6-метоксифенил)-5*H*-бензо[с]пиримидо[4,5-*e*]азепин-2-ил)амино)-2-метоксибензойная кислота и имеет структуру:

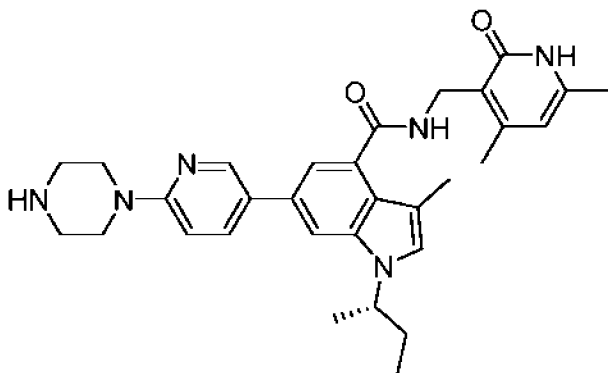


[00230] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор энхансера гомолога zeste 2 (EZH2). Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой таземетостат, GSK126, CPI-1205, 3-деазанепланоцин А (DZNep), EPZ005687, EI1, UNC1999 или синефунгин или их стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

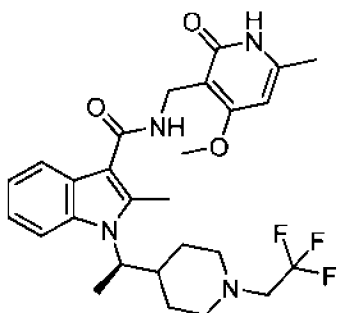
[00231] Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой таземетостат или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой таземетостат. Таземетостат (также известный как EPZ-6438) имеет химическое название N-[(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксо-3-пиридинил)метил]-5-[этил(тетрагидро-2H-пуран-4-ил)амино]-4-метил-4'-(4-морфолинилметил)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксамид и имеет структуру:



[00232] Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой GSK126 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой GSK126 (также известный как GSK-2816126). GSK126 имеет химическое название (S)-1-(втор-бутил)-N-((4,6-диметил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-3-метил-6-(6-(пиперазин-1-ил)пиридин-3-ил)-1H-индол-4-карбоксамид и имеет структуру:



[00233] Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой CPI-1205 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой CPI-1205. CPI-1205 имеет химическое название (R)-N-((4-метокси-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-метил-1-(1-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)этил)-1H-индол-3-карбоксаимид и имеет структуру:

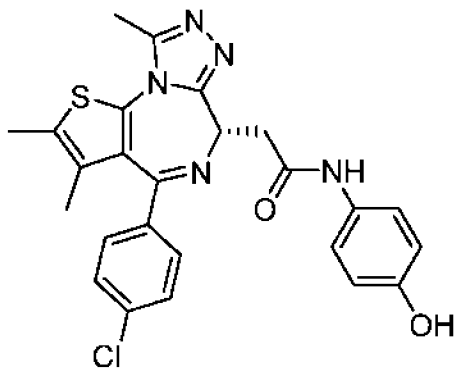


[00234] Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой 3-деазанепланоцин А. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой EPZ005687. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой EI1. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой UNC1999. Согласно одному варианту осуществления ингибитор EZH2 представляет собой синефунгин.

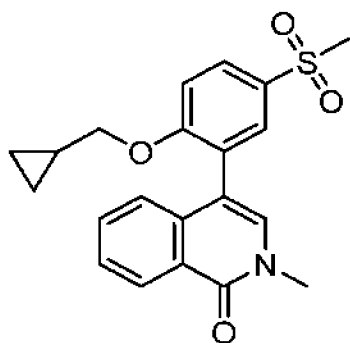
[00235] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор белка бромодомена и экстратерминального мотива (BET). Согласно одному варианту осуществления ингибитор BET представляет собой бирабресиб или 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[00236] Согласно одному варианту осуществления ингибитор BET

представляет собой бирабресиб или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BET представляет собой бирабресиб. Бирабресиб (также известный как OTX015 или МК-8628) имеет химическое название (S)-2-(4-(4-хлорфенил)-2,3,9-триметил-6Н-тиено[3,2-f][1,2,4]триазоло[4,3-a][1,4]дiazепин-6-ил)-N-(4-гидроксифенил)ацетамид и имеет структуру:



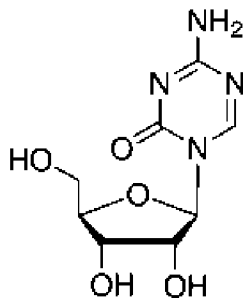
[00237] Согласно одному варианту осуществления ингибитор BET представляет собой 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BET имеет структуру:



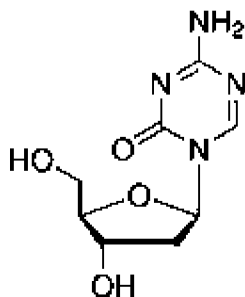
[00238] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой гипометилирующий агент. Согласно одному варианту осуществления гипометилирующий агент представляет собой 5-азацитидин или децитабин или их стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[00239] Согласно одному варианту осуществления гипометилирующий агент представляет собой 5-азацитидин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления гипометилирующий агент представляет собой 5-азацитидин. 5-азацитидин имеет химическое название 4-амино-1-β-D-рибофуранозил-1,3,5-триазин-2(1H)-он и имеет

структуру:



[00240] Согласно одному варианту осуществления гипометилирующий агент представляет собой децитабин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления гипометилирующий агент представляет собой децитабин. Децитабин имеет химическое название 4-амино-1-(2-деокси-β-D-эритро-пентофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1*H*)-он и имеет структуру:



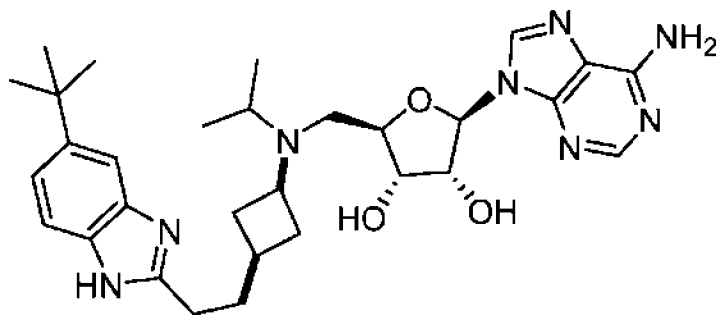
[00241] Согласно определенным вариантам осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой обинутузумаб, и гематологическая злокачественная опухоль представляет собой CLL. Согласно одному варианту осуществления второй активный агент включает введение терапевтически эффективного количества обинутузумаба в ходе одного или нескольких циклов лечения. Согласно одному варианту осуществления вводя дважды каждые 7 дней. Согласно одному варианту осуществления обинутузумаб вводят один раз каждую неделю. Согласно одному варианту осуществления обинутузумаб вводят один раз каждые 4 недели. Согласно одному варианту осуществления обинутузумаб вводят в дни 1, 2, 8 и 15 первого 28-ми дневного цикла, и вводят в день 1 от второго до шестого 28-ми дневных циклов.

[00242] Согласно одному варианту осуществления обинутузумаб вводят в дозе приблизительно 100 мг в день 1 первого 28-ми дневного цикла, приблизительно 900 мг в день 2 первого 28-ми дневного цикла и приблизительно 1000 мг в каждый из дней 8 и 15 первого 28-ми дневного цикла. Согласно одному варианту осуществления обинутузумаб вводят в дозе приблизительно 1000 мг в день 1 и 2 первого 28-ми дневного цикла и приблизительно 1000 мг в каждый из дней 8 и 15 первого 28-ми дневного цикла. Согласно

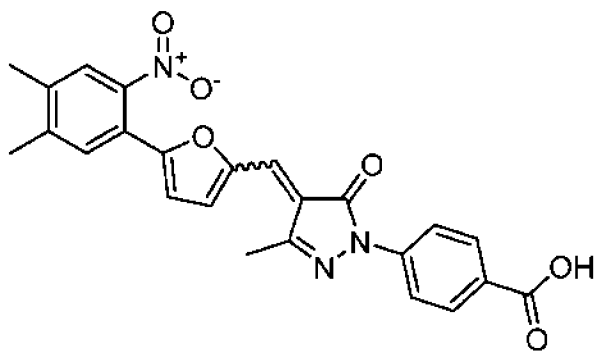
одному варианту осуществления обинутузумаб вводят в дозе приблизительно 1000 мг в день 1 от второго о шестого 28-дневных циклов.

[0100] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой обинутузумаб, и способ предусматривает введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) в комбинации со вторым активным агентов, раскрытым в настоящем документе (например, венетоклакс), и, кроме того, в комбинации с обинутузумабом.

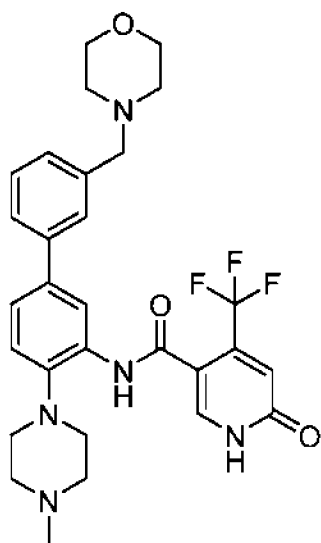
[00243] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор DOT1L. Согласно одному варианту осуществления ингибитор DOT1L представляет собой пинометостат или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор DOT1L представляет собой пинометостат. Пинометостат (также известный как EPZ-5676) имеет химическое название (2R,3R,4S,5R)-2-(6-амино-9H-пурин-9-ил)-5-((((1r,3S)-3-(2-(5-(трет-бутил)-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этил)циклобутил)(изопропил)амино)метил)тетрагидрофуран-3,4-диол и имеет структуру:



[00244] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор гистонацетилтрансферазы (НАТ). Согласно одному варианту осуществления ингибитор НАТ представляет собой C646 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор НАТ представляет собой C646. C646 имеет химическое название 4-(4-((5-(4,5-диметил-2-нитрофенил)фуран-2-ил)метил)-3-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-пиразол-1-ил)бензойная кислота и имеет структуру:

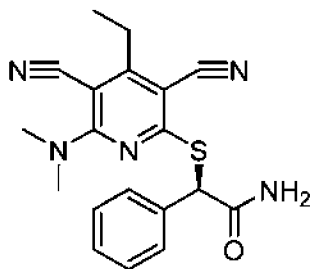


[00245] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор белка 5, содержащего повтор WD, (WDR5). Согласно одному варианту осуществления ингибитор WDR5 представляет собой OICR-9429 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор WDR5 представляет собой OICR-9429. OICR-9429 имеет химическое название N-(4-(4- метилпиперазин-1-ил)-3'-(морфолинометил)-[1,1'-бифенил]-3-ил)-6-оксо-4-(трифторметил)- 1,6-дигидропиридин-3-карбоксаимид и имеет структуру:



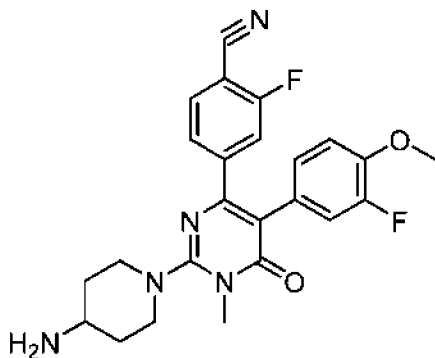
[00246] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор ДНК (цитозин-5)-метилтрансферазы 1 (DNMT1). Согласно одному варианту осуществления ингибитор DNMT1 представляет собой селективный ингибитор DNMT1. Согласно одному варианту осуществления селективный ингибитор DNMT1 представляет собой GSK3484862 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления селективный ингибитор DNMT1 представляет собой GSK3484862. GSK3484862 (также известный как GSKMI-714) имеет химическое название (R)-2-((3,5-дициано-6-

(диметиламино)-4-этилпиридин-2-ил)тио)-2-фенилацетамид и имеет структуру:



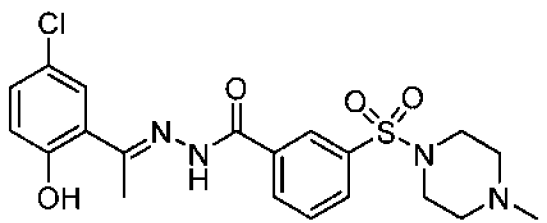
[00247] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор лизин-специфической деметилазы 1 (LSD-1). Согласно одному варианту осуществления ингибитор LDS-1 представляет собой Соединение С или секлидемстат или их таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

[00248] Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой Соединение С или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой Соединение С. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой фармацевтически приемлемую соль Соединения С. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой безилат Соединения С. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой монобезилат Соединения С. Соединение С имеет химическое название 4-(2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил)-2-фторбензонитрил и имеет структуру:

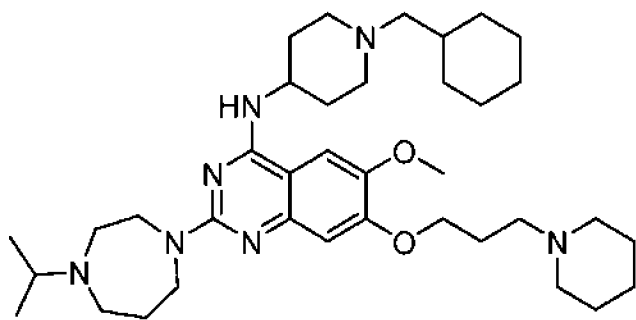


[00249] Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой секлидемстат или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой секлидемстат. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой фармацевтически приемлемую соль секлидемстата. Согласно одному варианту осуществления ингибитор LSD-1 представляет собой мезилат

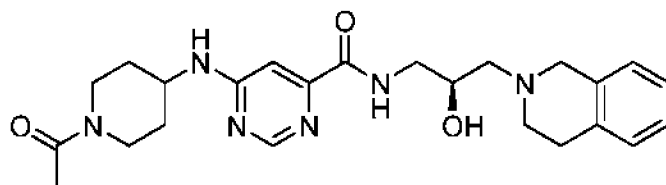
секлидемстата. Секлидемстат (также известный как SP-2577) имеет химическое название (E)-N'-(1-(5-хлор-2-гидроксифенил)этилиден)-3-((4-метилпиперазин-1-ил)сульфонил)бензогидразид и имеет структуру:



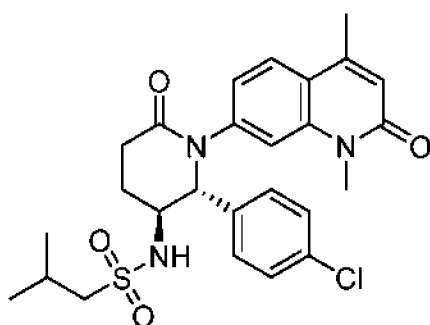
[00250] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор G9A (одна из метилтрансфераз гистона H3). Согласно одному варианту осуществления ингибитор G9A представляет собой UNC0631 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор G9A представляет собой UNC0631. UNC0631 имеет химическое название N-(1-(циклогексилметил)пиперидин-4-ил)-2-(4-изопропил-1,4-дiazепан-1-ил)-6-метокси-7-(3-(пиперидин-1-ил)пропокси)хиназолин-4-амин и имеет структуру:



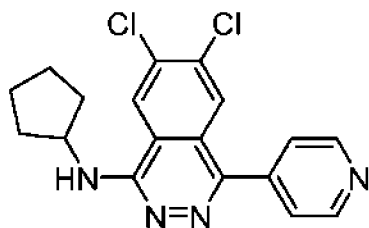
[00251] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор белок аргинин-метилтрансферазы 5 (PRMT5). Согласно одному варианту осуществления ингибитор PRMT5 представляет собой GSK3326595 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор PRMT5 представляет собой GSK3326595. GSK3326595 (также известный как EPZ-015938) имеет химическое название (S)-6-((1-ацетилпиперидин-4-ил)амино)-N-(3-(3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил)-2-гидроксипропил)пиримидин-4-карбоксамид и имеет структуру:



[00252] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор бромодомена (BRD). Согласно одному варианту осуществления ингибитор BRD представляет собой ингибитор BRD9/7. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BRD9/7 представляет собой LP99 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор BRD9/7 представляет собой LP99. LP99 имеет химическое название N-((2R,3S)-2-(4-хлорфенил)-1-(1,4-диметил-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-7-ил)-6-оксопиперидин-3-ил)-2-метилпропан-1-сульфонамид и имеет структуру:

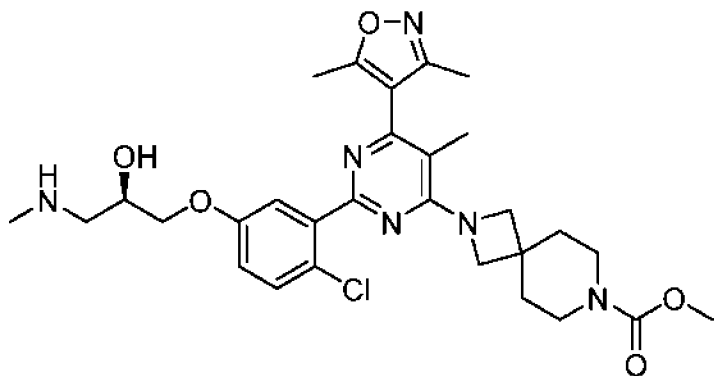


[00253] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой ингибитор SUV420H1/H2 (два гомологичных фермента, которые метилируют лизин 20 гистона H4). Согласно одному варианту осуществления ингибитор SUV420H1/H2 представляет собой A-196 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор SUV420H1/H2 представляет собой A-196. A-196 имеет химическое название 6,7-дихлор-N-циклопентил-4-(пиридин-4-ил)фталазин-1-амин и имеет структуру:



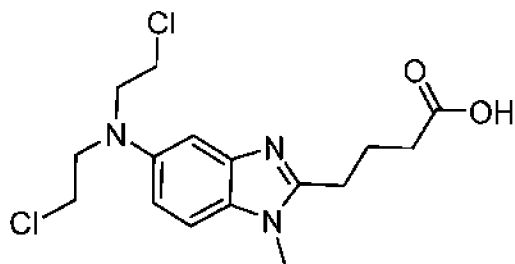
[00254] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой

ингибитор коактиватор-ассоциированный аргинин метилтрансферазы 1 (CARM1). Согласно одному варианту осуществления ингибитор CARM1 представляет собой EZM2302 или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления ингибитор CARM1 представляет собой EZM2302. EZM2302 имеет химическое название метил (R)-2-(2-(2-хлор-5-(2-гидрокси-3-(метиламино)пропокси)фенил)-6-(3,5-диметилизоксазол-4-ил)-5-метилпиримидин-4-ил)-2,7-дiazаспиро[3.5]нонан-7-карбоксилат и имеет структуру:

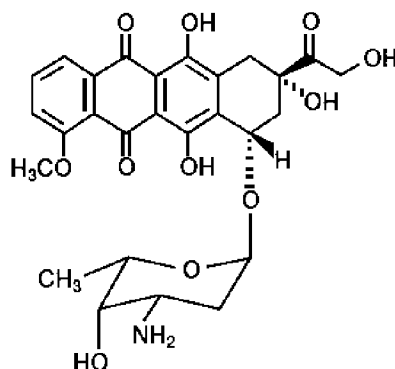


[00255] Согласно одному варианту осуществления второй активный агент, применяемый в способах, раскрытых в настоящем документе, представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой бендамустин, доксорубицин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, ифосфамид, мелфалан, оксалиплатин, дексаметазон или их стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог, пролекарство или фармацевтически приемлемую соль.

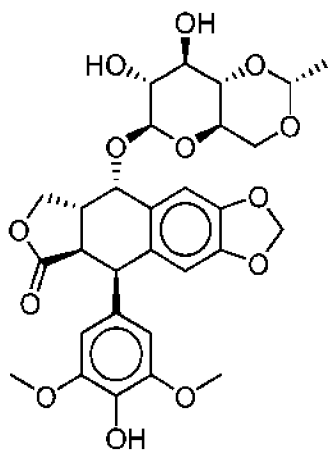
[00256] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой бендамустин или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой бендамустин. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фармацевтически приемлемую соль бендамустина. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой гидрохлорид бендамустина. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой моногидрохлоридную соль бендамустина. Бендамустин имеет химическое название 4-(5-(бис(2-хлорэтил)амино)-1-метил-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)бутановую кислоту и имеет структуру:



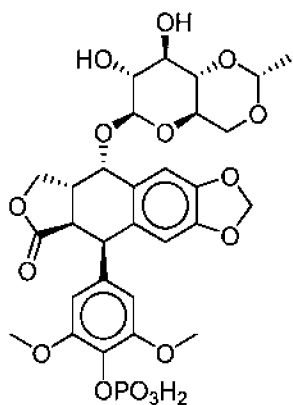
[00257] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой доксорубин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой доксорубин. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фармацевтически приемлемую соль доксорубина. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой гидрохлорид доксорубина. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой моногидрохлоридную соль доксорубина. Доксорубин имеет структуру:



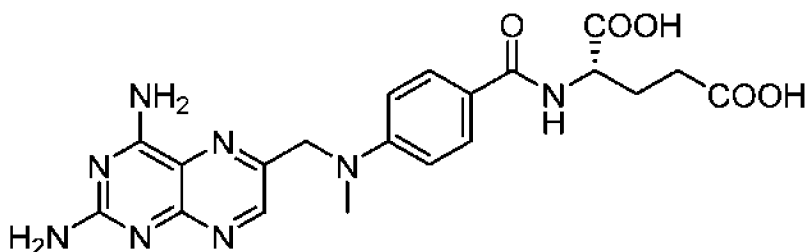
[00258] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой этопозид или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой этопозид. Этопозид имеет химическое название 4'-деметилэпиподофиллотоксин 9-[4,6-O-(R)-этилиден-β-D-глюкопиранозид] и имеет структуру:



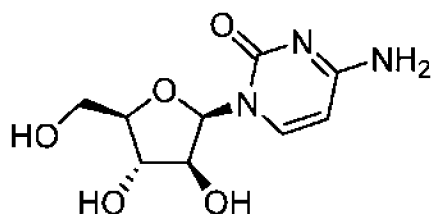
[00259] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой пролекарство этопозид. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой сложноэфирное пролекарство этопозид. Согласно одному варианту осуществления the химиотерапевтическое средство представляет собой фосфат этопозид. Этопозид фосфат имеет химическое название 4'-деметилэпиподофиллотоксин 9-[4,6-O-(R)-этилиден-β-D-глюкопиранозид], 4' (дигидрофосфат) и имеет структуру:



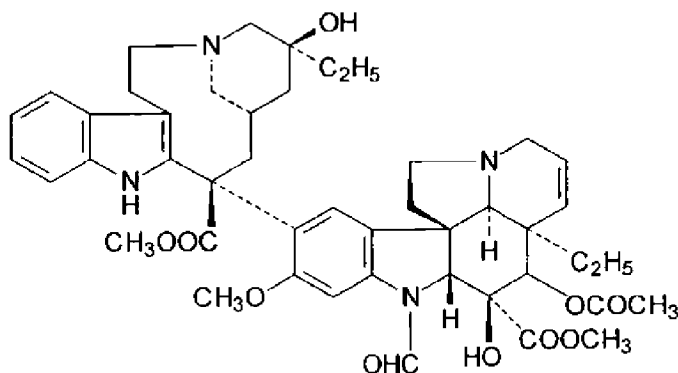
[00260] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой метотрексат или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой метотрексат. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фармацевтически приемлемую соль метотрексата. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой метотрексат натрий. Метотрексат имеет химическое название (4-(((2,4-диаминоптеридин-6-ил)метил)(метил)амино)бензоил)-L-глутаминовую кислоту и имеет структуру:



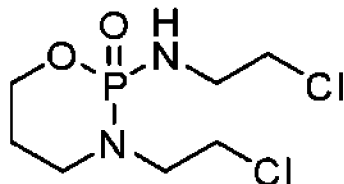
[00261] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой цитарабин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой цитарабин. Цитарабин имеет химическое название 4-амино-1-β-D-арабинофуранозил-2(1H)пиримидинон и имеет структуру:



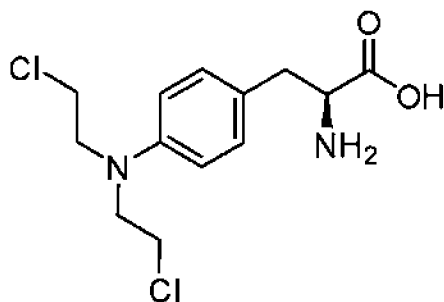
[00262] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой винкристин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой винкристин. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фармацевтически приемлемую соль винкрестина. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой винкристин сульфат. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой моносulfатную соль винкрестина. Винкристин имеет структуру:



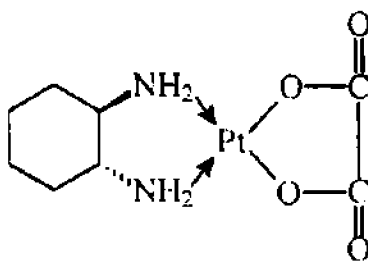
[00263] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой ифосфамид или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой ифосфамид. Ифосфамид имеет химическое название 3-(2-хлорэтил)-2-[(2-хлорэтил)амино]тетрагидро-2H-1,3,2-оксазафосфорин 2-оксид и имеет структуру:



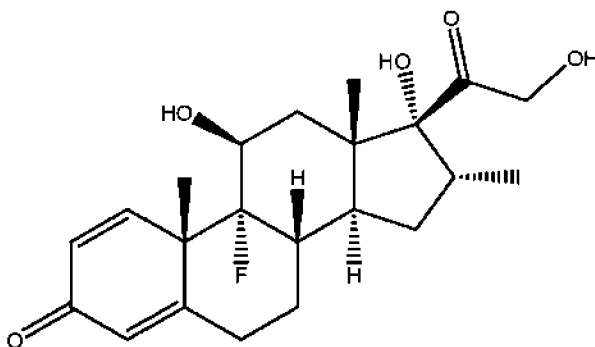
[00264] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой мелфалан или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой мелфалан. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой фармацевтически приемлемую соль мелфалана. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой мелфалан гидрохлорид. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой моногидрохлоридную соль мелфалана. Мелфалан имеет химическое название 4-[бис(2-хлорэтил)амино]-L-фенилаланин и имеет структуру:



[00265] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой оксалиплатин или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой оксалиплатин. Оксалиплатин имеет химическое название *cis*-[(1*R*,2*R*)-1,2-циклогександиамин-*N,N'*] [оксалато(2-)-*O,O'*]платина и имеет структуру:



[00266] Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой дексаметазон или его стереоизомер, смесь стереоизомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль. Согласно одному варианту осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой дексаметазон. Дексаметазон имеет химическое название (11b,16a)-9-фтор-11,17,21-тригидрокси-16-метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион и имеет структуру:



[00267] Согласно определенным вариантам осуществления второе терапевтическое средство вводят до, после или одновременно с соединением формулы (I). Введение соединения формулы (I) и второго терапевтического средства пациенту может происходить одновременно или последовательно одним и тем же или разными путями введения. Пригодность конкретного пути введения, используемого для конкретного второго лекарственного средства или агента, будет зависеть от самого второго терапевтического средства (например, можно ли его вводить перорально или местно без разложения до попадания в кровоток) и субъекта, подлежащего лечению. Конкретные пути введения второго лекарственного средства или агентов или ингредиентов известны специалистам в данной области техники. См., например, *The Merck Manual*, 448 (17th ed., 1999).

[00268] Можно вводить любую комбинацию вышеуказанных терапевтических средств, подходящую для лечения заболеваний или их симптомов. Такие терапевтические средства можно вводить в любой комбинации с соединением формулы (I) или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью, одновременно или в виде отдельного курса лечения.

[00269] В контексте настоящего изобретения термин «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства (например, профилактические и/или терапевтические средства) вводят пациенту, страдающему заболеванием или нарушением. Согласно одному варианту осуществления первая терапия (например, профилактическое или терапевтическое средство, такое как соединение, раскрытое в настоящем документе, например, Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль) вводят 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) введения второй терапии (например, второго активного агента согласно настоящему изобретению). Согласно одному варианту осуществления первую терапию (например, профилактическое или терапевтическое средство, такое как соединение, раскрытое в настоящем документе, например, Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль) вводят одновременно с введением второй терапии (например, второго активного агента, раскрытого в настоящем документе). Согласно одному варианту осуществления первую терапию (например, профилактическое или терапевтическое средство, такое как соединение, раскрытое в настоящем документе, например, Соединение 1, Соединение 2 или Соединение 3, или их энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль) вводят 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) введения второй терапии (например, второго активного агента, раскрытого в настоящем документе).

[00270] Введение Соединения 1, Соединения 2 или Соединения 3 или их энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли и второго активного агента, раскрытых в настоящем документе, 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 кровоток).

[00271] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами. Понятно, что приведенное выше подробное описание и сопровождающие примеры являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничение объема настоящего

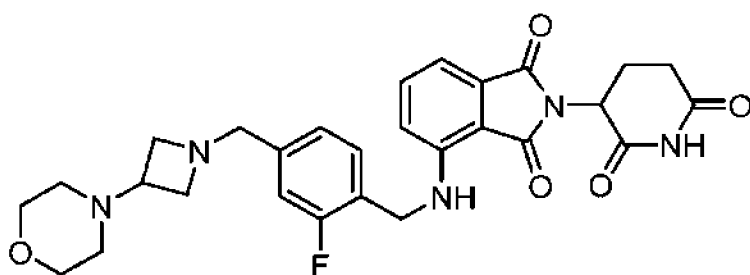
изобретения. Специалистам в данной области техники очевидны различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления. Такие изменения и модификации, включая без ограничения относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным продуктам, синтезам, составам и/или способам применения, раскрытым в настоящем документе, могут быть выполнены без отступления от их сущности и объема. Патенты США и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки.

6. Примеры

[00272] Приведенные ниже примеры осуществляют 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.

[00273] Описанные выше варианты осуществления предназначены только в качестве иллюстративных, и для специалистов в данной области техники известно или возможно установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, веществ и процедур. Все такие эквиваленты рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения и охватываются прилагаемой формулой изобретения.

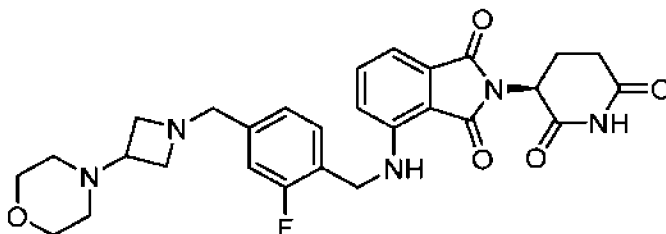
Пример 1. Синтез 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 3)



[00274] К раствору 4-((4-(хлорметил)-2-фторбензил)амино)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона (215 мг, 0,500 ммоль) (приготовленного как описано в настоящем документе) и гидрохлорид 4-(азетидин-3-ил)морфолина (107 мг, 0,600 ммоль) в сухом DMSO (1,7 мл) добавляли DIEA (262 мкл, 1,50 ммоль) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 48 часов. Реакционную смесь разбавляли 20% муравьиной кислотой в DMSO (2,5 мл) и фильтровали через мембранный шприцевой фильтр (нейлон 0,45 мкм). Раствор очищали стандартными способами с

получением 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (173 мг, выход 64,6%). LCMS (ESI) m/z 536,2 $[M+H]^+$

Пример 2. Синтез (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 1)



[00275] (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-(гидроксиметил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион

[00276] Суспензию (S)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона (5,00 г, 18,3 ммоль) и 2-фтор-4-(гидроксиметил)бензальдегида (2,82 г, 18,30 ммоль) в 2:1 диоксан-MeOH (75 мл) охлаждали до 0 °C, и $B_{10}H_{14}$ (4,92 г, 40,3 ммоль) добавляли небольшими порциями в течение 5 минут. Реакционную колбу оборудовали резиновой прокладкой инжектора и игольчатым клапаном (давление) и энергично перемешивали в течение 10 минут. Смеси оставляли до достижения температуры окружающей среды и перемешивали в течение 3 часов. Смесь концентрировали, и остаток очищали хроматографией на силикагеле (0-10% MeOH-DCM) с получением (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-(гидроксиметил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона в виде твердого вещества желтого цвета (4,23 г, 56%). LCMS (ESI) m/z 411,8 $[M+H]^+$.

[00277] (S)-4-((4-(Хлорметил)-2-фторбензил)амино)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион

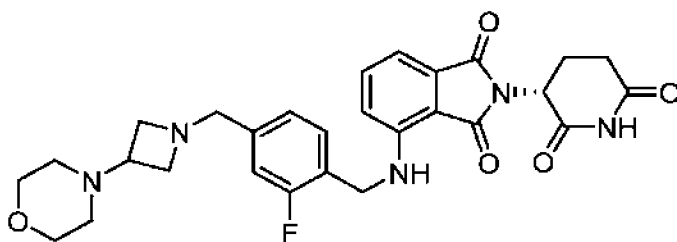
[00278] Раствор (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-(гидроксиметил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (0,727 г, 1,77 ммоль) в сухом NMP (6 мл) охлаждали до 0 °C и последовательно добавляли метансульфонилхлорид (0,275 мл, 3,35 ммоль) и DIEA (0,617 мл, 3,53 ммоль). Реакционную смесь оставляли до достижения температуры окружающей среды и перемешивали в течение 18 часов. Реакционную смесь медленно добавляли к H_2O (60 мл), охлажденной до 0 °C, при интенсивном перемешивании. Полученную суспензию фильтровали, а собранное твердое вещество промывали H_2O и Et_2O . Твердое вещество растворяли в EtOAc, раствор сушили с $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали с получением (S)-4-((4-(хлорметил)-2-фторбензил)амино)-2-(2,6-

диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона в виде твердого вещества желтого цвета (0,600 г, 79%). LCMS (ESI) m/z 430,0 $[M+H]^+$.

[00279] (S)-2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион

[00280] К раствору (S)-4-((4-(хлорметил)-2-фторбензил)амино)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона (300 мг, 0,698 ммоль) в сухом DMSO (1,0 мл) добавляли гидрохлорид 4-(азетидин-3-ил)морфолина (125 мг, 0,698 ммоль) и DIEA (0,122 мл, 0,698 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 18 часов и разбавляли в DMSO (1 мл). Раствор очищали хиральной обращенно-фазовой хроматографией с получением (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (89 мг, 24%, 97% ee). LCMS (ESI) m/z 536,2 $[M+H]^+$.

Пример 3. Синтез (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (Соединение 2)



[00281] Хиральная обращенно-фазовая хроматография, описанная в Примере 2, дополнительно приводила к (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диону (16 мг, 97% ee) LCMS (ESI) m/z 535,6 $[M+H]^+$.

Пример 4. Соединение 1 индуцировало апоптоз и ингибировало пролиферацию в клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

[00282] Активность Соединения 1 оценивали на панели из двадцати трех клеточных линий диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). Панель DLBCL включала семь клеточных линий, классифицированных как подтип активированных В-клеток (ABC), тринадцать клеточных линий, классифицированных как подтип В-клеток зародышевого центра (GCB), и три клеточных линии, классифицированных как первичная медиастинальная В-клеточная лимфома (PMBL). Кроме того, многие из этих клеточных линий демонстрировали сходные цитогенетические (одновременная перестройка MYC и/или BCL2 и/или BCL6) и молекулярные

характеристики, наблюдаемые у пациентов с DLBCL высокого риска. Таким образом, одиннадцать клеточных линий имеют $t(8;14)(q24;q32)$ и/или $t(14;18)(q32;q21.3)$, соответствующих перестройкам генов *MYC* и *BCL2* в локусе тяжелой цепи иммуноглобулина (IG), а также дополнительные перестройки, влияющие на *BCL6* (Табл. 1). Транслокация *MYC*, *BCL6* или *BCL2* в локусе *IG* обычно приводит к высоким уровням мРНК и белка из-за активной транскрипции, управляемой конститутивно активным промотором *IG*. Поэтому уровни белков этих генов контролировали с помощью вестерн-блоттинга, подтверждая сверхэкспрессию *BCL2*, *MYC* и/или *BCL6* во всех оцениваемых клеточных линиях (фиг. 1, панель А). Также оценивали экспрессию белка *CRBN* и известных субстратов Ikaros, Aiolos и ZFP91 (фиг. 1, панели В и С).

Таблица 1. Характеристики клеточной линии диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

Клеточная линия	Подтип DLBCL	MYC	BCL2	BCL6	Соответствующий частичный кариотип
TMD8(1)	ABC	ND	ND	ND	Постоянная аномалия не обнаружена
SU-DHL-10	GCB	+ IG	+ IG	ND	$t(8;14)(q24;q32)$, $t(14;18)(q32;q21)$; несет параллельную перестройку IGH с MYC и BCL2
SU-DHL-2	ABC	ND	ND	ND	Постоянная аномалия не обнаружена
Karp4-422	GCB	ND	+ IG	ND	$t(14;18)$ IGH-BCL2 $t(4;11)(q21;q23)$ MLL/AF4
SU-DHL-8	GCB	+ IG	ND	ND	$t(8;22)(q24;q11)$; несет $t(8;22)$, осуществляющий перегруппировку IGL-MYC
Farage	PMBL	ND	ND	ND	Постоянная аномалия не обнаружена
OCI-Ly-7	GCB	+ IG	+AMP	+AMP	$t(8;14)(q24;q32)$, $del(18)(q21.1)$; несет $t(8;14)$, влияющий на перегруппировку

					MYC-IGH
SU-DHL-6	GCB	+ не- IG	+ IG	ND	t(8;9)(q24;p13), t(8;19;9)(q24;q13;p13), t(14;18)(q32;q21)
Karpas-1106P	PMBL	ND	ND	ND	Постоянная аномалия не обнаружена
WSU-DLCL-2	GCB	+ не- IG	+ IG	+ не- IG	t(3;8)(q27;q24), t(14;18)(q32;q21)
OCI-Ly10	ABC	+AMP	+AMP	ND	Дополнительных хромосомных перестроек не обнаружено
U-2940	PMBL	ND	ND	ND	Несет гомозиготную микроделецию локуса SOCS1
U-2932	ABC	ND	+ AMP	+ AMP	Обширная геномная амплификация областей BCL2 и BCL6
RIVA	ABC	+ не- IG	+ AMP	ND	t(4;8)(q22;q24); amp(18)(q21)dup(18)(q21q23)
SU-DHL-16	GCB	ND	+ IG	ND	t(14;18)(q32;q21) транслокация
RC-K8	ABC	ND	ND	+ не- IG	t(3;7)(q27;q32) ; t(11;14)(q23;q32); несет точки разрыва в REL и IGH- DDX6
HT	GCB	ND	ND	ND	Ни IGH-BCL2 или другие соответствующие перестройки не были обнаружены
SU-DHL-4	GCB	+ не- IG	+ IG	+ не- IG	t(1;3)(q42;q27), t(14;18)(q32;q21)
Toledo	GCB	ND	+ IG	ND	t(14;18)(q32;q21)
OCI-LY-19	GCB	+ не- IG	+ IG	+AMP	t(4;8)(q32;q24), t(14;18)(q32;q21)
Pfeiffer	GCB	ND	+ IG	ND	t(14;18)(q32;q21)
OCI-LY-3	ABC	+ AMP	+ AMP	+AMP	t(4;18) с увеличением количества копий области BCL2

DB	GCB	+ не- IG	+ IG	+ не- IG	t(3;8)(q27;q24), t(14;18)(q32;q21)
----	-----	----------	------	----------	---------------------------------------

ABC = активированная В-клетка, DLBCL = диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, GCB = В-клетка зародышевого центра; PMBL = первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, +AMP = амплификация гена, ND = хромосомальные перестройки не выявлены.

Таблица 2. Антипролиферативная активность и апоптотический эффект Соединения 1 в клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

Клеточная линия	% жизнеспособных клеток				Апоптоз			
	AUC	IC ₅₀	E _{max}	Чувствительность	AUC	EC ₅₀	E _{max}	Чувствительность
SU-DHL-10	3,371	0,01	2,477	Высокая	815,3	0,01634	81,92	Высокая
TMD8	3,911	0,003	1,365	Высокая	826,8	0,004443	83,15	Высокая
SU-DHL-2	6,871	0,0013	1,264	Высокая	745	0,007779	75,15	Высокая
KARPAS-422	45,21	0,0054	1,584	Высокая	682,2	0,0325	70,47	Высокая
SU-DHL-8	54,43	0,25	2,508	Высокая	652,5	0,509	70,52	Высокая
Farage	59,29	0,0037	1,676	Высокая	503,6	0,07361	54,17	Высокая
OCI-LY-7	61,98	0,0036	1,657	Высокая	673,2	0,01278	68,82	Высокая
SU-DHL-6	88,38	0,26	5,843	Высокая	421,1	0,452	46,26	Высокая
KARPAS-1106P	110,9	0,025	1,183	Высокая	597,7	0,05612	59,77	Высокая
WSU-DLCL2	173,8	0,02	1,36	Высокая	464,5	0,07701	47,81	Высокая
OCI-Ly10	267,3	0,05	19,19	Средняя	187,7	2,093	29,41	Средняя
U2940	289,1	0,035	29,24	Средняя	267,4	0,0679	29,04	Средняя
U2932	327,1	0,1	24,81	Средняя	280,5	11,94	69,92	Средняя
RIVA	395,8	0,05	36,99	Средняя	216,6	0,01897	22,67	Средняя
SU-DHL-16	359,7	0,12	30,33	Средняя	159,1	0,2615	18,2	Средняя
RC-K8	409,1	0,1	34,92	Средняя	81,59	0,2301	9,528	Средняя
HT	434,8	0,47	45,18	Средняя	158,2	0,007821	16,58	Средняя

SU-DHL-4	457,4	0,5	41,79	Средняя	155,2	0,4522	18,92	Средняя
Toledo	507	0,5	52,68	Средняя	114,8	0,5	13,97	Средняя
OCI-LY-19	283,3	0,03	28,11	Средняя	293,5	0,08092	30,64	Средняя
Pfeiffer	912,3	NA	86,19	Ограниченная	133,5	0,3	8,01	Ограниченная
OCI-LY-3	986,1	NA	84,33	Ограниченная	7,009	0,00046	0,7533	Ограниченная
DB	1173	NA	107,1	Ограниченная	0	NA	NA	Ограниченная

AUC = площадь под кривой; IC₅₀ = 50% ингибирующая концентрация; E_{max} = достигнута максимальная эффективность; NA = не достигнуто.

[00283] Панель клеточных линий обрабатывали увеличивающимися дозами соединений в течение пяти дней, в это время измеряли количество жизнеспособных клеток и определяли степень апоптоза путем отсутствия окрашивания 7-AAD и аннексином V с использованием проточной цитометрии. Таблица 2 показывает, что восемнадцать из двадцати трех оцененных линий были высокочувствительными к Соединению 1 *in vitro* после пяти дней обработки со значениями IC₅₀ между 0,001 и 0,4 мкМ. В целом, чувствительность к Соединению 1 не зависела от происхождения клеток (COO), поскольку подтипы ABC, GCB и PMBL были чувствительны к Соединению 1 (Таблица 2). Кроме того, Соединение 1 продемонстрировало сильную антипролиферативную активность в линиях с хромосомными транслокациями MYC, BCL2 и BCL6 и/или с высокими уровнями экспрессии белка для этих генов, что указывает на возможность широкой активности Соединения 1 в отношении ряда подтипов DLBCL (фиг. 1, Таблица 2).

[00284] Кривые доза-ответ, показывающие потерю жизнеспособных клеток, индуцированную Соединением 1, в панели клеточных линий DLBCL, описывают три категории ответа (Таблица 2). Десять клеточных линий были высокочувствительны к Соединению 1, и после обработки оставалось менее 6% жизнеспособных клеток (E_{max}), десять клеточных линий показали промежуточную чувствительность с жизнеспособностью клеток от 15% до 55%, а три клеточные линии имели ограниченный ответ или не отвечали на Соединение 1 (Таблица 2). Для дополнительной характеристики антипролиферативного действия Соединения 1 оценивали окрашивание аннексином V и 7-AAD в качестве индикаторов апоптоза. Резкую индукцию апоптоза наблюдали в тех же клеточных линиях, которые были идентифицированы как чувствительные к Соединению 1 в анализах роста клеток (Таблица 2).

[00285] В дополнение к этому результаты показали, что антипролиферативные свойства Соединения 1 не коррелировали с абсолютным уровнем исходной экспрессии цереблona. В некоторых клеточных линиях ингибирование клеточного роста имело одинаковые величины, даже несмотря на то, что уровни экспрессии белка цереблona были

разными (фиг. 1, панели В и С).

[00286] В совокупности эти результаты показали, что окрашивание аннексином V и 7-AAD можно применять как индикаторы апоптоза, и что эти маркеры коррелируют с активностью Соединения 1.

Пример 5. Соединение 1 ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз в устойчивых к лекарственным средствам клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

[00287] Активность Соединения 1 тестировали на клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), которые были резистентны к терапевтическим средствам, используемым в клинике для лечения заболевания. С этой целью модели чувствительности или резистентности Соединения 1 сравнивали с доксорубицином, венетоклаксом и ибрутинибом (три лекарственными средствами с известной активностью при DLBCL). Активность Соединения 1 также оценивали в клеточных линиях с приобретенной устойчивостью к доксорубицину.

[00288] Для начала активность Соединения 1 сравнивали с активностью лекарственных средств, используемых в настоящее время для лечения DLBCL, путем воздействия на ту же панель из двадцати трех клеточных линий (Таблица 1) доксорубицином, венетоклаксом и ибрутинибом. Большинство клеточных линий демонстрировали различные модели чувствительности к Соединению 1, доксорубицину, ибрутинибу и венетоклаксу (Таблица 3). Все клеточные линии DLBCL были высоко чувствительны к доксорубицину, включая три клеточные линии, нечувствительные к Соединению 1 (Таблица 3). Девять клеточных линий, чувствительных к Соединению 1, были резистентны к венетоклаксу, а десять клеточных линий, чувствительных к Соединению 1, были резистентны к ибрутинибу, тогда как четыре клеточные линии, высоко чувствительные к Соединению 1 (SU-DHL-2, Farage, RIVA, WSU-DLBCL2), были резистентны как к венетоклаксу, так и к ибрутинибу (Таблица 3). Это показало, что Соединение 1 было эффективным в клеточных линиях, резистентных или невосприимчивых к лекарственным средствам, используемым в настоящее время для лечения DLBCL, таким как венетоклакс и ибрутиниб.

Таблица 3. Концентрации IC₅₀ для Соединения 1, доксорубина, венетокласа и ибрутиниба в клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

Клеточная линия	IC ₅₀ (мкМ)			
	Соединение 1	Доксорубин	Венетоклас	Ибрутиниб
SU-DHL-10	3,4	0,6	454	128
TMD8	4	0,7	390	9
SU-DHL-2	7	1,3	355	496
KARPAS- 422	45	1,0	75	182
SU-DHL-8	54	0,6	548	360
Farage	59	1,2	560	104
OCI-LY-7	62	5	1008	763
SU-DHL-6	88	3	174	216
KARPAS- 1106P	111	1,7	200	211
WSU-DLCL2	174	1,5	215	161
OCI-Ly10	267	3	200	532
OCI-LY-19	283	2	300	400
U2940	289	2	706	367
U2932	327	3	230	362
SU-DHL-16	360	1,5	21	92
RIVA	396	5,5	5	173
RC-K8	409	3,5	609	1061
HT	435	2	644	483
SU-DHL-4	457	1	145	303
Toledo	507	4	500	847
Pfeiffer	855	3	432	725
OCI-LY-3	986	11,6	1023	915
DB	1173	3,8	82	1016

[00289] Активность Соединения 1 также оценивали в клеточных линиях с приобретенной резистентностью к доксорубину (Таблица 4). Резистентные к доксорубину клеточные линии (DoxoR) были созданы путем культивирования родительских клеточных линий *in vitro* с возрастающими концентрациями доксорубина в течение длительного периода времени (от ~ 9 до 18 месяцев), пока они не могли расти в присутствии относительно высокой концентрации доксорубина (1 мкМ). Соответствующие родительские клетки (М-родительская) были созданы путем поддержания родительских клеток в культуре без обработки в течение того же периода времени (от ~ 9 до 18 месяцев). Ингибирующее рост действие доксорубина на

родительские клетки и соответствующие резистентные клетки оценивали путем измерения количества жизнеспособных клеток и степени апоптоза путем отсутствия окрашивания 7-AAD и аннексином V с использованием проточной цитометрии. Значения IC_{50} и кривые ингибирования роста клеток для доксорубина показаны в Таблице 4. В клеточных линиях DoxoR ингибирующее рост действие доксорубина было значительно снижено, по сравнению с его действием на соответствующие родительские клетки. Сдвиги значений IC_{50} для доксорубина в линиях DoxoR были более чем в 100 раз (Таблица 4).

[00290] Определяли влияние Соединения 1 на жизнеспособность резистентных к доксорубину клеточных линий, по сравнению с родительскими (фиг. 2, Таблица 5). Для резистентных клеток OCI-Ly10 была измерена приблизительно в 20 раз большая чувствительность к Соединению 1, по сравнению с родительскими клетками (IC_{50} 6 мкМ в родительских клетках, по сравнению с IC_{50} 0,3 мкМ в резистентных клетках) и более чем в 100 раз большая чувствительность к Соединению 1 наблюдали в резистентной к доксорубину клеточной линии SU-DHL-4 (от $IC_{50} > 10$ до 0,1 мкМ).

[00291] Повышенная антипролиферативная активность, наблюдаемая для Соединения 1 в OCI-Ly10 и SU-DHL-4 резистентных клетках, сопровождалась увеличением способности Соединения 1 индуцировать апоптоз. В клетках WSU-DLCL2 Соединение 1 индуцировало больший апоптоз (что отражалось в более высоком значении E_{max}) в клеточной линии DoxoR, чем в М-родительской линии, особенно при более высоких концентрациях (от 0,1 до 1 мкМ), несмотря на более низкую активность в линии DoxoR ($IC_{50} = 0,1$ мкМ) относительно М-родительской клеточной линии ($IC_{50} = 0,01$ мкМ). В резистентных к доксорубину клетках U2932 наблюдали 20-кратно более низкую чувствительность к Соединению 1, а также более низкую индукцию апоптоза, по сравнению с М-родительской клеточной линией (фиг. 2, Таблица 5).

[00292] Эксперименты вестерн-блоттинга (фиг. 3) показали, что повышенный апоптотический эффект Соединения 1 в SU-DHL-4 клетках, резистентных к доксорубину, коррелирует с потерей экспрессии BCL2 в этой клеточной линии. Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия BCL2 может служить маркером ответа на Соединение 1, в том числе в клеточных линиях, резистентных к лекарственным средствам.

[00293] Таким образом, Соединение 1 было эффективным в отношении определенных резистентных к лекарственным средствам клеточных линий. Соединение 1 продемонстрировало дозозависимые антипролиферативные ответы и ответы уничтожения клеток во всех протестированных резистентных к доксорубину клеточных линиях, что указывает на то, что перекрестная резистентность к Соединению 1 может не быть обычным

явлением после приобретения резистентности к доксорубину. Также было продемонстрировано отсутствие перекрестной резистентности между Соединением 1 и венетоклаксом или ибрутинибом. Кроме того, маркеры апоптоза, такие, как окрашивание аннексином V и 7-AAD и экспрессия белка Bcl-2, могут указывать на ответ на Соединение 1.

Таблица 4. Антипролиферативная активность доксорубина в доксорубин-резистентных и родительских диффузных клеточных линиях крупноклеточной В-клеточной лимфомы

Клеточная линия		Доксорубин IC ₅₀ (мкМ)
Oci-Ly10	М-родительская	0,02
	DoxoR	1,4
U2932	М- родительская	0,01
	DoxoR	1,08
WSU-DLCL2	М- родительская	0,01
	DoxoR	1,6
SU-DHL-4	М- родительская	0,01
	DoxoR	1,5

DoxoR = резистентный к доксорубину, IC₅₀ = 50% ингибирующая концентрация, М-родительская = соответствующая родительская.

Таблица 5. Антипролиферативная активность Соединения 1 в клеточных линиях диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, чувствительных и резистентных к доксорубину

Клеточная линия		IC ₅₀ (мкМ)	E _{max} (% оставшихся жизнеспособных клеток)
Oci-Ly10	М-родительская	6	47
	DoxoR	0,3	22
U2932	М- родительская	0,06	19
	DoxoR	1,5	31
	М- родительская	0,01	23

WSU-DLCL2	DoxoR	0,1	9
	M- родительская	>10	74
SU-DHL-4	DoxoR	0,1	8

DoxoR = резистентный к доксорубину, E_{max} = максимальный ингибирующий ответ по сравнению с DMSO, IC₅₀ = 50% ингибирующая концентрация, M-родительская = соответствующая родительская.

Пример 6. Соединение 1 проявляет селективную противовоспалительную, иммуномодулирующую активность, активность в отношении фиброза и ремоделирования матрикса в системах первичной монокультуры и сокультур

[00294] Активность Соединения 1 определяли в группе анализов на основе первичных клеток человека, моделирующих сложную биологию тканей и заболеваний органов (сосудистую систему, иммунную систему, кожу, легкие) и общую биологию тканей с использованием системы BioMAP (DiscoverX, Fremont, CA).

[00295] Система BioMAP состоит из двенадцати первичных систем монокультуры или сокультур человека в стимулированных и нестимулированных контрольных условиях (фиг. 4, панель А). При тестировании в концентрациях 0,01, 0,1, 1 и 10 мкМ Соединение 1 опосредованно приводило к изменениям активности ключевых биомаркеров. В частности, профили для Соединения 1 отражали избирательное противовоспалительное и иммуномодулирующее действие на моноциты (LPS) и зависимые от Т-клеток ответы активации В-клеток (BT). Лечение Соединением 1 приводило к снижению уровня интерлейкина 8 (IL-8), интерлейкина 1α (IL-1α), секретируемого простагландина E₂ (sPGE₂) и секретируемого фактора некроза опухоли альфа (sTNFα) в системе LPS, состоящей из периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC) и эндотелиальных клеток. Кроме того, секретируемый IgG (sIgG), секретируемый интерлейкин 17A (sIL-17A), секретируемый интерлейкин 17F (sIL-17F) и sTNFα уменьшались, тогда как секретируемый интерлейкин 2 (sIL-2) и секретируемый интерлейкин 6 (sIL-6) увеличивались, в системе BT, которая состояла из В-клеток и PBMC. Кроме того, Соединение 1 продемонстрировало убедительное ингибирование экспрессии коллагена-I и -III, а также незначительное ингибирование экспрессии ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) в системе MyoF, состоящей из фибробластов легких, моделируя фиброз и биологию, связанную с ремоделированием матрикса.

[00296] В заключение, профили Соединения 1 в панели BioMAP Diversity PLUS показали, что соединение проявляет противовоспалительную, иммуномодулирующую активность, активность в отношении фиброза и ремоделирования

матрикса в системах первичной монокультуры и сокультур. Кроме того, это продемонстрировало, что экспрессия IL-8, IL-1 α , sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, коллагена-I и -III и PAI-1 может служить биомаркерами ответа на лечение Соединением 1.

Пример 7. Антипролиферативная активность Соединения 1 зависит от цереблona

[00297] Цереблон работает как рецептор-субстрат для CRL4 убиквитин-Е3-лигазы, а связывание цереблон модулирующих соединений (СМ) индуцирует рекрутирование, убиквитинирование и разрушение ключевых субстратов-мишеней, таких как Ikaros, Aiolos и ZFP91, для опосредования клеточных эффектов.

[00298] Чтобы определить, зависит ли сильная антипролиферативная активность Соединения 1, продемонстрированная в клеточных линиях DLBCL, от связывания с цереблоном, была использована технология редактирования генов CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии цереблona. Активированные В-клетки (ABC) и клеточные линии SU-DHL-2 и RIVA с двойной экспрессией MYC/BCL2, В-клетки зародышевого центра (GCB) и клеточные линии Karpas-422, SU-DHL-10, WSU-DLCL2 с двойной транслокацией MYC/BCL2 (и экспрессирующие BCL6), и клеточные линии Farage первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы (PMBL) инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей CAS9, для получения контрольных клеток, экспрессирующих CAS9. Клетки Cas9 имели экспрессию цереблona дикого типа (CRBNWT).

[00299] Для получения нокаутных клеток по цереблону (CRBN^{-/-}) отдельные контрольные клетки CAS9 инфицировали конструкцией, экспрессирующей субгеномную одиночную направляющую РНК (sgРНК). Вестерн-блот-анализ подтвердил отсутствие белка цереблona в CRBN^{-/-}-клетках по сравнению с уровнями белка «домашнего хозяйства» β -тубулина. Клетки CRBN^{WT} и CRBN^{-/-} обрабатывали возрастающими концентрациями Соединения 1 в течение пяти дней. Результаты показали, что контрольные CAS9-экспрессирующие клетки (CRBN^{WT}), были чувствительны к Соединению 1 (IC₅₀ в диапазоне от 2,5 и 40 нМ, Таблица 6), тогда как нокаутные клетки CRBN блокировали антипролиферативную активность Соединения 1 (Таблица 6), что указывает на то, что антипролиферативное действие Соединения 1 на клетки DLBCL является цереблон-зависимым. Эти результаты показывают, что CRBN может служить биомаркером для лечения Соединением 1

Таблица 6: Влияние Соединения 1 на пролиферацию клеток в клеточных линиях CRBN^{WT} и CRBN^{-/-} диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

	CRBN ^{WT} клетки		CRBN ^{-/-} клетки
	IC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)	IC ₅₀ (нМ)
SU-DHL2	2,5	1	10000 <
RIVA	8	30	10000 <
Karpas-422	15	5	10000 <
SU-DHL10	35	0	10000 <
WSU-DLCL2	40	19	10000 <
Farage	8	0,5	10000 <

IC₅₀ = 50% ингибирующая концентрация, E_{max} = максимально достижимый ответ.

Пример 8. Лечение Соединением 1 Диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы вызывало быструю потерю Aiolos, Ikaros и ZFP91 и индуцировало апоптоз *In Vitro*

[00300] Влияние Соединения 1 на клеточную деградацию известных белков-субстратов цереблona тестировали на сконструированных клеточных линиях. Используя анализ комплементации ферментных фрагментов (EFC), клеточные линии DF15, экспрессирующие ePL-меченые целевые белковые субстраты Aiolos, Ikaros и ZFP91, проверяли на деградацию через 1, 2, 6 и 24 часа в диапазоне концентраций от 6 пМ до 10. мкМ. Были оценены измерения уровней белка Ikaros, Aiolos и ZFP91 (Таблица 7). После обработки различными концентрациями Соединения 1 в течение разных периодов времени оставшиеся субстраты, меченные ePL, в клетках оценивали с использованием планшета для считывания люминесценции. В этих анализах Соединение 1 индуцировало зависящую от времени и концентрации потерю Aiolos (Таблица 7), Ikaros (Таблица 7) и ZFP91 (Таблица 7). Соединение 1 показало высокую эффективность (низкие наномолярные или ниже наномолярных значений EC₅₀ (Таблица 7)) в отношении разложения Aiolos, Ikaros и ZFP91 во всех временных точках 1, 2, 6 и 24 часа после добавления Соединения к культурам. Однако Соединение 1 достигло максимальной эффективности (E_{max}), разлагая три субстрата (от 1% до 10% оставшегося субстрата) после 6-часовой обработки и при таких низких концентрациях, как 15 нМ. Кинетика деградации не изменилась в течение 24-часового периода времени и максимальный эффект деградации сохранялся до последней временной точки 24 часа (Таблица 7).

[00301] Результаты анализов клеточной деградации с использованием меченых рекомбинантных белков известных субстратов цереблona показали, что Соединение 1

является мощным и эффективным «разрушителем» Ikaros, Aiolos и ZFP91 (Таблица 7), и что эти субстраты служат полезными биомаркерами для оценки активности Соединения 1.

Таблица 7. Анализ кривых Концентрация - Ответ для индуцированной Соединением 1 деградации субстратов в различные моменты времени

	Aiolos		Ikaros		ZFP91	
Временная точка (часы)	EC₅₀ (нМ)	E_{max} (%)	EC₅₀ (нМ)	E_{max} (%)	EC₅₀ (нМ)	E_{max} (%)
1	0,6	60	0,6	75,5	1	64
2	0,5	16,5	0,8	33	0,5	26,5
6	0,2	6	0,5	1,5	0,2	4
24	0,2	7	0,4	0,03	0,1	2,5

EC₅₀ = концентрация препарата, дающая полумаксимальный ответ, E_{max} = максимально достижимый ответ, ZFP91 = белок «цинковый палец» 91.

Пример 9. Соединение 1 способствовало деградации эндогенных субстратов в клеточных линиях DLBCL цереблон-зависимым образом и индуцировало апоптоз

[00302] Для того, чтобы оценить, может ли Соединение 1 способствовать деградации эндогенных субстратов в клеточных линиях DLBCL цереблон-зависимым образом и продемонстрировать потенциальный механизм индукции апоптоза, было проведено исследование ответа в зависимости от времени и концентрации с Соединением 1 в линиях активированных В-клеток (ABC), SU-DHL-2^{CRBNWT} CAS9 контрольных клеток и нокаутных по цереблону SU-DHL2^{CRBN^{-/-}} клеток.

[00303] Обработка Соединением 1 в дозах всего 1 нМ приводила к потере эндогенных белков Ikaros, Aiolos и ZFP91 в зависимости от времени и концентрации в клетках SU-DHL-2^{CRBNWT}, но не в клетках SU-DHL-2^{CRBN^{-/-}}, что указывает на потребность цереблону в индуцированной Соединением 1 деградации эндогенных субстратов в DLBCL (фиг. 5, панель А, панель В и панель С). Анализ динамики показал, что воздействие Соединением 1 приводило к быстрой деградации Aiolos, Ikaros и ZFP91 уже через 4 часа после обработки всеми концентрациями, и что воздействие 10 и 100 нМ концентрациями Соединения 1 приводило к полному подавлению экспрессии белков Ikaros, Aiolos и ZFP91 на протяжении всего курса лечения. При этих двух концентрациях и одновременно с сильным подавлением субстратов цереблону обработка Соединением 1 индуцировала интерферон-стимулированные гены IRF7 и IFIT3, снижала экспрессию MYC и IRF4 и

индуцировала экспрессию апоптотических маркеров [расщепляющие каспазы 3 и 7 и расщепленная поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP)] уже через 24 часа после обработки (фиг. 5, панели А и В). Однако Соединение 1 не обладало активностью в клетках SU-DHL-2^{CRBN^{-/-}}, что указывает на необходимость цереблona для индукции апоптоза Соединением 1 в DLBCL (фиг. 5С).

[00304] Для того, чтобы подтвердить время индукции апоптоза и его зависимость от цереблona, использовали визуализатор живых клеток, который обеспечивает кинетические данные активации каспазы-3 в реальном времени (индикатор апоптоза). Клетки SU-DHL-2^{CRBN^{WT}}, обработанные Соединением 1, анализировали на активацию каспазы-3 путем отслеживания расщепления в клетках специфического субстрата фермента каспазы-3 в течение 112 часов. Зависимая от Соединения 1 индукция активности каспазы-3 начиналась через 12 часов после обработки и достигала максимальной индукции примерно через 72 часа (фиг. 5D). Эти результаты подтверждают зависимость цереблona и быструю индукцию апоптоза в клетках DLBCL Соединением 1 в концентрациях 10 нМ или выше.

[00305] Для подтверждения того, что быстрая деградация субстратов и индукция апоптоза Соединением 1 не являются уникальными для клеток SU-DHL2, клетки TMD8 (линия клеток ABC) и Каrpa-422 (линия клеток GCB) обрабатывали контрольным носителем (DMSO) или Соединением 1 в указанные моменты времени и концентрации (фиг. 6). Анализ динамики показывает, что воздействие Соединения 1 приводило к быстрой деградации Ikaros и ZFP91 уже через 4 часа после обработки всеми концентрациями Соединения 1. Воздействие 10 и 100 нМ Соединения 1 приводило к полному подавлению экспрессии белков Ikaros, Aiolos и ZFP91 на протяжении всего курса лечения (фиг. 6, панель А и С). При этих двух концентрациях и одновременно с сильным подавлением субстратов цереблona обработка Соединением 1 индуцировала интерферон-стимулированные гены DDX58, IRF7 и IFIT3, снижала экспрессию MYC и IRF4 (только в TMD8, так как линия GCB Каrpa-442 не экспрессирует IRF4) и индуцировала экспрессию маркеров апоптоза уже через 24 часа (TMD8) и через 48 часов (Каrpa-422) (фиг. 6, панель А и С).

[00306] Во втором эксперименте мы подтвердили, что обработка TMD8 Соединением 1 (100 нМ) приводила к значительному снижению Aiolos, Ikaros и ZFP91 через 24 часа. Кроме того, Соединение 1 резко снижало количество BCL6 (снижение на 65%), MYC (снижение на 75%) и IRF4 (снижение на 90%) и вызывало сильную индукцию расщепляющей каспазы 3 (фиг. 6, панель В), подтверждая быструю индукцию гибели клеток уже через 24 часа в клетках TMD8 (фиг. 6, панель В). В клетках Каrpa-422 Соединение 1 также приводило к снижению Aiolos, Ikaros и ZFP91 на момент времени 24

часа (фиг. 6, панель D). В момент времени 48 часов Соединение 1 повышало содержание ингибитора пролиферации p21 и интерферон-стимулированных генов IRF7, IFIT3 и DDX58 и снижало экспрессию MYC (фиг. 6, панель D). Через 72 часа в клетках, обработанных Соединением 1, наблюдалось снижение уровней MYC (снижение на 50%), антиапоптотического BCL2 и белка сурвивина, а также сильная индукция маркеров апоптоза, расщепляющих каспаз 3 и 7 и расщепленной поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) (фиг. 6, панель D).

[00307] В совокупности эти данные показывают, что связывание Соединения 1 с цереблном приводит к почти полной деградации Ikaros, Aiolos и ZFP91, что приводит к сильной и быстрой индукции апоптоза в клетках DLBCL. Более того, эти данные показывают, что помимо цереблona, Ikaros, Aiolos и ZFP91, интерферон-стимулируемые гены DDX58, IRF7 и IFIT3, апоптотические связанные белки BCL2, сурвивин, расщепляющие каспазы 3 и 7 и расщепленная поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP), а также экспрессия BCL6, MYC и IRF4 могут служить маркерами ответа на Соединение 1.

Пример 10. Множественные субстраты цереблona опосредовали цитотоксические эффекты Соединения 1

[00308] Соединение 1 индуцирует автономную активность по уничтожению клеток в DLBCL цереблон-зависимым образом. Чтобы исследовать последствия потери одного субстрата цереблona, CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут субстрата цереблona в сочетании с анализом клеточной конкуренции на основе проточной цитометрии использовали для оценки относительной пригодности клеток после нокаута гена в шести клеточных линиях DLBCL: KARPAS-422, U-2932, RIVA, SU-DHL-16, HT и SU-DHL-4 (фиг. 7, панель A). Для проведения анализа конкуренции на основе проточной цитометрии стабильные Cas9-экспрессирующие DLBCL клетки трансдуцировали контрольной нецелевой конструкцией sgPHK, содержащей репортер GFP (sgNT-1-GFP), или конструкцией sgPHK, нацеленной на представляющий интерес ген, содержащей репортер RFP (sgPHK-RFP). Для целенаправленного нокаута каждого гена использовали две последовательности sgPHK: для нокаута Ikaros (sgIKZF1-1, sgIKZF1-2), Aiolos (sgIKZF3-1, sgIKZF3-2) и ZFP91 (sgZFP91-1, sgZFP91-3). Для контроля были включены две нецелевые sgPHK (sgNT-1, sgNT-2), sgPHK, нацеленная на некодирующую область генома (sgNC-1), и sgPHK, нацеленная на установленный незаменимый ген ETF1 (sgETF1-1). После трансдукции sgPHK клетки промывали и смешивали в соотношении 1:1, и процентное содержание клеток GFP⁺ и RFP⁺ измеряли каждые три дня в течение восемнадцати дней (фиг. 7, панель B). Снижение соотношения RFP⁺/GFP⁺ с течением времени указывает на

снижение приспособленности клеток из-за нокаута гена, на который нацелена sgPHK в конструкции, содержащей RFP-репортер. Как и ожидалось, во всех шести линиях DLBCL нокаут основного гена ETF1 приводил к сильному снижению соотношения RFP⁺/GFP⁺ (фиг. 7, панель В). Второй нецелевой контроль (sgNT-2) вел себя очень похожим образом на первый нецелевой контроль (sgNT-1) и не показал изменений в соотношении RFP⁺/GFP⁺. Кроме того, во всех шести линиях DLBCL, трансдуцированных sgPHK, нацеленной на некодирующую область генома (sgNC-1), наблюдалось небольшое снижение приспособленности клеток, предположительно из-за индукции двухцепочечного разрыва в ДНК, что приводило к остановке клеточного цикла G2.

[00309] Нокаут Ikaros, Aiolos и ZFP91 привел к различному снижению соотношения RFP⁺/GFP⁺ в панели клеточных линий DLBCL, что указывает на очень разную степень важности каждого гена в разных клеточных линиях. Кроме того, нокаут одного гена Ikaros, Aiolos или ZFP91 не приводил к такой же степени снижения соотношения RFP⁺/GFP⁺, как это наблюдалось при нокауте ETF1 ни в одной из клеточных линий. В некоторых клеточных линиях снижение соотношения RFP⁺/GFP⁺, наблюдаемое при нокауте Ikaros, Aiolos или ZFP91, было аналогично наблюдаемому при некодирующей sgPHK (sgNC-1), предполагая, что нокаут гена имел такую же степень ингибирования приспособленности клеток, как и индукция ответа на повреждение ДНК. Нокаут гена в каждой линии был подтвержден анализом иммуноблоттинга и показал, что клетки DLBCL, экспрессирующие Cas9, имели специфический нокаут по указанным генам-мишеням в каждой из клеточной линии KARPAS-422-Cas9, U-2932-Cas9, RIVA-Cas9, SU-DHL-16-Cas9, HT-Cas9 и SU-DHL-4-Cas9, экспрессирующей направляющие PHK для sgNT-1, sgNT-2, sgNC-1, sgIKZF1-1, sgIKZF1-2, sgIKZF3-1, sgIKZF3-2, sgZFP91-1, sgZFP91-3, и sgETF1-1 клеток.

[00310] В целом, эти данные показывают, что потеря одного субстрата цереблona не полностью объясняет цитотоксический эффект Соединения 1 и что антипролиферативный эффект может быть обусловлен согласованной потерей множества субстратов цереблona, на которые нацелено Соединение 1. Таким образом, эти результаты демонстрируют, что оценку более чем одного субстрата цереблona можно использовать в качестве ответа на Соединение 1.

Пример 11: Потеря Ikaros или Aiolos клеточных линий диффузной крупной В-клеточной лимфомы, чувствительных к Соединению 1

[00311] Для изучения того, может ли потеря нескольких субстратов цереблona, на которые нацелено Соединение 1, взаимодействовать друг с другом, вызывая усиленное

ингибирование приспособленности клеток, отдельные субстраты удаляли и одновременно обрабатывали возрастающими концентрациями Соединения 1. Если взаимодействие между субстратами существует в опосредовании антипролиферативного эффекта Соединения 1, прогрессирующая потеря любого отдельного субстрата должна сделать клетки более чувствительными к этому соединению. Аналогичный анализ клеточной конкуренции на основе проточной цитометрии, представленный на фиг. 7, панель А, использовали для оценки повышенной чувствительности к Соединению 1 при нокауте гена субстрата. На повышенную чувствительность к Соединению 1 из-за ускоренной потери одного субстрата посредством нокаута гена указывает усиленное снижение соотношения RFP⁺/GFP⁺ клеток с нокаутом гена при обработке Соединением 1 по сравнению с DMSO.

[00312] Как и ожидалось, в контрольных KARPAS-422 (фиг. 8, панель А) и SU-DHL-4 (фиг. 8, панель В) sgNT-1 клетках (крайняя левая группа) было мало изменений в соотношении RFP⁺/GFP⁺ с добавлением 0,1 нМ, 1 нМ и 10 нМ Соединения 1 (серые столбцы), по сравнению с клетками, обработанными диметилсульфоксидом (DMSO) (крайний левый столбец в каждой подгруппе). Однако в sgIKZF1 (вторая группа слева; sgIKZF1-1, тонкие линии под углом вправо, и sgIKZF1-2, толстые линии под углом вправо) и sgIKZF3 (третья группа слева, sgIKZF3-1, тонкие линии под углом влево, и sgIKZF3 -2, толстые линии под углом влево) нокаутных клетках, обработанных Соединением 1, наблюдалось дозозависимое снижение соотношения RFP⁺/GFP⁺, по сравнению с их соответствующими контрольными клетками, обработанными DMSO (крайний левый столбец в каждой подгруппе). Этот эффект не наблюдался в клетках sgZFP91 (крайняя правая группа, sgZFP91-1, тонкий клетчатый рисунок, и sgZFP91-3, жирный клетчатый рисунок), что позволяет предположить, что потеря ZFP91 не коррелирует с потерей других субстратов цереблona, на которые направлено действие Соединения 1, с усилением антипролиферативного действия Соединения 1. Кроме того, наблюдалось снижение соотношения RFP⁺/GFP⁺ с течением времени для всех обработанных DMSO нокаутных клеток sgIKZF1, sgIKZF3 и sgZFP91 (крайние левые черные столбцы в каждой подгруппе) относительно обработанных DMSO контрольных клеток sgNT-1 (крайние левые черные столбцы в каждой подгруппе), что является результатом снижения приспособленности клеток из-за нокаута соответствующего гена и согласуется с данными, представленными на фиг. 7, панель В. Кроме того, с помощью анализа иммуноблоттинга было подтверждено, что 24-часовая обработка Соединением 1 эффективно способствует деградации субстрата в клетках с нокаутом субстрата (фиг. 9). Следовательно, эти результаты показывают, что Ikaros, Aiolos и, в меньшей степени, ZFP91 могут служить маркерами чувствительности к Соединению 1.

Пример 12: Комбинированная потеря Ikaros и Aiolos оказала аддитивное влияние на ингибирование приспособленности клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

[00313] Ikaros и Aiolos являются высоко гомологичными факторами транскрипции, которые могут образовывать гомодимеры или гетеродимеры. Для того, чтобы выяснить, могут ли Ikaros и Aiolos обладать какой-либо избыточностью в обеспечении выживания и пролиферации клеток DLBCL, был проведен двойной нокаут Ikaros и Aiolos, опосредованный sgPHK, в шести клеточных линиях DLBCL: KARPAS-422, U-2932, RIVA, SU-DHL-16, HT и SU-DHL-4. Для оценки пригодности клеток использовали конкурентный анализ на основе проточной цитометрии, где клетки трансдуцировали sgNT-1-GFP или конструкциями, экспрессирующими две sgPHK из одного и того же вектора с репортером RFP (фиг. 10, панель А). Комбинации двойных sgPHK представляли собой sgNT-1+sgNT-2, sgIKZF1-1+sgNT-1, sgIKZF1-1+sgNT-2, sgIKZF3-1+sgNT-1, sgIKZF3-1+sgNT-2, sgIKZF1-1+sgIKZF3-1 и sgIKZF1-2+sgIKZF3-2. После трансдукции клетки снова один раз промывали и смешивали в соотношении 1:1, и процентное содержание клеток GFP⁺ и RFP⁺ измеряли каждые три дня в течение пятнадцати дней.

[00314] Во всех шести клеточных линиях нокаут как Ikaros, так и Aiolos вызывал большее снижение отношения RFP⁺/GFP⁺, по сравнению с нокаутом только Ikaros или Aiolos (фиг. 10, панель В). Специфичность нокаута Ikaros, Aiolos или обоих была подтверждена анализом иммуноблоттинга и показала, что клетки DLBCL, экспрессирующие Cas9, имели специфический нокаут по IKZF1 или IKZF3 в клеточных линиях, содержащих соответствующую gPHK для гена (генов) в каждой из клеточной линии KARPAS-422-Cas9, U-2932-Cas9, RIVA-Cas9, SU-DHL-16-Cas9, HT-Cas9 и SU-DHL-4-Cas9, экспрессирующих двойные направляющие PHK для sgIKZF1-1+sgNT-1, sgIKZF1-1+sgNT-2, sgIKZF3-1+sgNT-1, sgIKZF3-1+sgNT-2, sgIKZF1-1+sgIKZF3-1 и sgIKZF1-2+sgIKZF3-2, в то время, как sgNT-1+sgNT-2 не показали изменений в уровнях белка IKZF1 или IKZF3.

[00315] Эти результаты показали, что Ikaros и Aiolos обладают некоторыми повторяющимися функциями в клеточных линиях DLBCL, и что потеря или деградация как Ikaros, так и Aiolos могут служить маркером ответа на Соединение 1.

Пример 13. Ингибирование деградации Ikaros или Aiolos защищенных от Соединения 1 клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы

[00316] Для того, чтобы проверить, являются ли Ikaros и Aiolos избыточными в обеспечении выживания и пролиферации линий DLBCL, устойчивые к деградации

мутанты Ikaros (IKZF1-G151A), Aiolos (IKZF3-G152A) и ZFP91 (ZFP91-G405A), наряду с люциферазой NanoLuc (Nluc) в качестве контроля эктопически и стабильно экспрессировали в четырех клеточных линиях DLBCL: KARPAS-422, RIVA, HT и SU-DHL-4. Кривые доза-ответ для Соединения 1 показали, что экспрессия устойчивых к деградации мутантов Ikaros или Aiolos обеспечивала защиту от Соединения 1 во всех четырех клеточных линиях (фиг. 11). Кроме того, эктопическую экспрессию устойчивых к деградации мутантов, а также их защиту от деградации, вызванную Соединением 1, подтверждали анализом иммуноблоттинга. Например, анализ иммуноблоттинга показал, что на уровни белков Ikaros, Aiolos и ZFP91 существенно не влияла обработка Соединением 1 в клеточных линиях KARPAS-422, RIVA, HT и SU-DHL-4, эктопически экспрессирующих устойчивые к деградации мутанты Ikaros (IKZF1-G151A), Aiolos (IKZF3-G152A) или ZFP91 (ZFP91-G405A) относительно тех же клеточных линий, эктопически экспрессирующих Nluc. Например, обработка клеток, экспрессирующих Nluc, 5 нМ или 50 нМ Соединения 1 приводила к заметному снижению уровней белков IKZF1, IKZF3 и ZFP91, по сравнению с контрольными клетками или клетками, обработанными DMSO. Уровни бета-актина использовали в качестве контроля. Эктопическая экспрессия IKZF1-G151A в четырех клеточных линиях показала, что уровни белка IKZF1 не снижались в ответ на обработку 5 нМ или 50 нМ Соединения 1 в течение 24 часов, но уровни IKZF3 и ZFP91 по-прежнему снижались в ответ на обработку Соединением 1. Аналогичные закономерности наблюдались с IKZF3-G152A и ZFP91-G405A. Однако в четырех клеточных линиях наблюдались различные степени защиты. В KARPAS-422 и SU-DHL-4 наблюдалась почти полная защита от Соединения 1, что позволяет предположить, что Ikaros и Aiolos обладают действительно избыточными функциями в этих линиях. Однако в HT и RIVA защита была не такой надежной. В совокупности эти данные подчеркивают значение Ikaros, Aiolos или обоих в ответе на Соединение 1.

Пример 14. Соединение 1 способствует деградации Ikaros в Т-клетках, не оказывая существенного влияния на их жизнеспособность

[00317] Оценивали иммуномодулирующую активность Соединения 1 *ex vivo* стимулированных PBMC. Прогрессирование заболевания у пациентов с лимфомой было связано с нарушением функции иммунной системы. Истощенные Т-клетки демонстрировали сниженную дифференцировку, пролиферацию и функцию продукции цитокинов.

[00318] Очищенные PBMC от четырех здоровых доноров высевали на планшеты, покрытые антителами к CD3 для стимуляции Т-клеток, и затем обрабатывали

либо DMSO (контроль), либо Соединением 1 в различных концентрациях. Способность Соединения 1 стимулировать деградацию Ikaros оценивали с течением времени с помощью проточной цитометрии (фиг. 12). Соединение 1 индуцировало зависимую от концентрации деградацию Ikaros в PBMC, о чем свидетельствует снижение процентной доли клеток, которые были положительными по Ikaros с течением времени. Кроме того, деградация сохранялась до 7 дней после однократной обработки Соединением 1.

[00319] Для того, чтобы установить, что это происходит из-за действия соединения на стимуляцию деградации Ikaros, а не из-за отсутствия клеточной пролиферации или жизнеспособности CD3-стимулированных PBMC, влияние Соединения 1 на их жизнеспособность оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки, обработанные Соединением 1, не показали значительного влияния на жизнеспособность PBMC, которое было сравнимо с таковым контрольных клеток, обработанных DMSO, с течением времени. Мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от четырех здоровых доноров, подвергали воздействию Соединения 1 в концентрациях 0,1, 1, 10 или 100 нМ в течение 3, 4 или 7 дней, и жизнеспособность измеряли путем окрашивания красителем Viability™ Fixable Dye. Результаты показали, что на 3-й и 4-й день приблизительно 80% PBMC были жизнеспособны, а Соединение 1 не оказывало существенного влияния ни при одной из концентраций. Тенденция к жизнеспособности клеток сохранялась до дня 7, при этом обработка Соединением 1 не влияла на жизнеспособность PBMC.

[00320] Эти результаты демонстрируют, что уровни экспрессии Ikaros в Т-клетках могут снижаться под действием Соединения 1, и что уровни Ikaros могут служить маркером ответа на Соединение 1 в Т-клетках.

Пример 15. Влияние Соединения 1 на эффекторные лимфоциты и продукцию цитокинов

[00321] Результаты Примера 14 показали, что Соединение 1 способствует деградации Ikaros, и известно, что Ikaros действует как репрессор экспрессии и секреции IL-2, маркера активации Т-клеток. Соответственно, оценивали влияние Соединения 1 на секрецию цитокинов эффекторными Т-клетками.

[00322] Очищенные PBMC от четырех здоровых доноров высевали на планшеты, покрытые антителами к CD3 для стимуляции Т-клеток, а затем обрабатывали либо DMSO (контроль), либо Соединением 1 в различных концентрациях в течение 3, 4 и 7 дней. Секрецию цитокинов измеряли в надосадочной жидкости из культур PBMC с течением времени с использованием мезомасштабных (MSD) анализов. Секреция

интерлейкина-2 РВМС во время культивирования *in vitro* увеличивалась при воздействии Соединения 1, как показано на фиг. 13 и фиг. 14. Соединение 1 индуцировало секрецию IL-2 при всех испытанных концентрациях. Эта активность в отношении IL-2 проявлялась при концентрациях Соединения 1 (от 0,1 до 100 нМ), которые, как было показано, вызывают сильную антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеток DLBCL. Для других контролируемых цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-4, IL-13, IL-10 и IL-6) наблюдался временный эффект или его отсутствие. Это продемонстрировало, что секреция IL-2 может служить маркером ответа на Соединение 1, особенно для активации Т-клеток.

Пример 16. Соединение 1 индуцировало секрецию цитокинов/хемокинов в истощенных Т-клетках

[00323] Истощенные Т-клетки фенотипически отличаются от функциональных эффекторных Т-клеток, поскольку они приобретают экспрессию ингибирующих сигнальных путей, включая белок 1 запрограммированной клеточной гибели (PD1) и белок 3 гена активации лимфоцитов (LAG3). Истощенные Т-клетки демонстрировали сниженную дифференцировку, пролиферацию и продукцию цитокинов.

[00324] Для того, чтобы вызвать истощение Т-клеток, РВМС от трех доноров обрабатывали в течение 72 часов 100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина В (SEB) (фиг. 15, панель А и панель С). На 3-й день SEB отмывали и экспрессию маркеров истощения PD1 и LAG3 CD3-положительных Т-клеток анализировали с помощью FACS (фиг. 15, панель В). Истощенные Т-клетки одного донора затем обрабатывали Соединением 1 в течение 96 часов, а истощенные Т-клетки двух дополнительных доноров обрабатывали Соединением 1 в течение 48 и 96 часов в присутствии 1 нг/мл SEB, и высвобождение эффекторных цитокинов в культуральную среду оценивали с помощью анализа MSD. Результаты показали, что Соединение 1 повышало уровни секреции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), гамма-интерферона (IFN γ) и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) зависимым от концентрации и времени образом, что измеряли с помощью мезомасштабного анализа (MSD) через 48 часов или 96 часов. Например, приблизительно 0,001 мкМ Соединения 1 в течение 96 часов приводило к образованию 3000 пг/мл GM-CSF, тогда как приблизительно 0,01 мкМ Соединения 1 в течение 96 часов приводило к 10000 пг/мл GM-CS, и секретируемое количество продолжало увеличиваться до тех пор, пока не станет чуть ниже 15000 пг/мл при концентрациях выше 0,1 мкМ Соединения 1. Воздействие Соединения 1 в течение 96 часов показало, что 96 часов обработки Соединением 1 приводили к более высокому количеству высвобождаемого GM-CSF и TNF α и в меньшей степени IFN γ , по сравнению с воздействием в течение 48 часов.

[00325] Соединение 1 индуцировало секрецию эффекторных цитокинов/хемокинов GM-CSF, TNF α и IFN γ в анализе повторной стимуляции Т-клеток. Соединение 1 также показало активность в отношении индукции секреции трех эффекторных цитокинов/хемокинов при концентрациях в диапазоне от 0,01 до 10 мкМ и в трех оцениваемых донорских PBMC. Значения EC₅₀, достигнутые для уровней секретируемого GM-CSF (EC₅₀ = 0,006 мкМ), TNF α (EC₅₀ = 0,01 мкМ) и IFN γ (EC₅₀ = 0,01 мкМ), подтверждают, что иммуномодулирующая активность Соединения 1 проявляется при концентрациях с сильным противоопухолевым эффектом *in vitro*.

[00326] В совокупности эти результаты показали, что Соединение 1 обладает иммуномодулирующей активностью. Следует отметить, что иммуномодулирующая активность проявляется при аналогичных концентрациях, которые приводят к противоопухолевым эффектам на панели клеточных линий DLBCL. Кроме того, эти результаты показали, что секреция эффекторных цитокинов/хемокинов GM-CSF, TNF α и IFN γ Т-клетками может служить маркером ответа на Соединение 1, и что экспрессия PD-1 и LAG3 может использоваться в качестве маркера идентификации клеток, которые могут отвечать на обработку Соединением 1.

Пример 17. Соединение 1 и его R-энантиомер проявляли аналогичную антипролиферативную активность и связывали цереблон

[00327] Для оценки активности как Соединения 1, так и Соединения 2 в клетках DLBCL проводили анализ CellTiter-Glo (CTG) для измерения антипролиферативной активности. Мощную антипролиферативную активность в клеточной линии DLBCL SU-DHL-4 наблюдали для обоих Соединений 2 и 3 (Таблица 8).

Таблица 8. Антипролиферативная активность энантиомеров в клетках диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, которую оценивали в течение 5-дневного анализа

Клеточная линия DLBCL	Антипролиферативная активность IC ₅₀ (мкМ)	
	Соединение 1 (S- энантиомер)	Соединение 2 (R-энантиомер)
SU-DHL-4	0,022 (n = 6)	0,032 (n = 6)

DLBCL = диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, IC₅₀ = 50% ингибирующая концентрация.

[00328] Для исследования того, может ли Соединение 1 и его R-энантиомер, Соединение 2, связываться с цереблоном, использовали анализ конкуренции лигандов короткой продолжительности (от 10 до 20 минут). Образцы Соединения 1 и Соединения 2 с хиральной чистотой более 99% оценивали на аффинность связывания цереблона в анализе TR-флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) (Таблица 8). Результаты показали, что как Соединение 1, так и Соединение 2 связываются с CRBN зависимым от концентрации образом. В частности, Соединение 1 имело в одиннадцать раз более высокую аффинность связывания CRBN ($IC_{50} = 0,86 \pm 0,1$ мкМ, $n = 5$), по сравнению с соединением 2 ($IC_{50} = 10,25 \pm 1$ мкМ, $n = 5$).

[00329] Совместно эти результаты показали, что как Соединение 1, так и Соединение 2 проявляли активность в клетках DLBCL, и что цереблон может служить маркером ответа.

Пример 18. Соединение 1 и Соединение 2 вызывали деградацию Aiolos, Ikaros и ZFP91

[00330] Чистые образцы каждого энантиомера тестировали на клеточную деградацию белков-субстратов, измеряемую в течение короткого периода времени (фиг. 16). Клетки SU-DHL-2 обрабатывали в течение 1, 2 и 6 часов контрольным носителем (0,1% DMSO), Соединением 1 (1, 10, 100 нМ) или Соединением 2 (1, 10, 100 нМ). Вестерн-блот-анализ использовали для оценки степени деградации белковых субстратов Aiolos, Ikaros и ZFP91. Соединение 1 ингибировало Aiolos, Ikaros и ZFP91 уже через 1 час после обработки всего лишь 1 нМ. Более 50% деградации каждого из трех белков произошло в течение 2 часов при 1 нМ Соединения 1, и все три белка показали одинаковую скорость деградации. Соединение 2 также приводило к снижению экспрессии Aiolos, Ikaros и ZFP91, хотя и с различной кинетикой (фиг. 16). Например, сниженная экспрессия Aiolos, Ikaros и ZFP91 наблюдалась при более высоких концентрациях и более длительном периоде воздействия Соединения 2.

[00331] Во втором анализе клеточные линии DF15, экспрессирующие субстраты белка-мишени, меченные ePL, использовали в качестве системы-модели для мониторинга деградации белка в 0,75, 1, 1,5, 3, 4 и 24 часа в диапазоне концентраций от 1 пМ до 10 мкМ. Оцениваемыми белками были Ikaros (фиг. 17), Aiolos и ZFP91. Соединение 1 и Соединение 2 оба были способны разрушать белки субстрата во все моменты времени (Таблица 9). В дальнейшем анализе были включены дополнительные временные точки для мониторинга эффекта обработки Соединением 1 и Соединением 2. Результаты подтверждают, что Соединение 1 и Соединение 2 разрушали Aiolos, Ikaros и ZFP91

зависимым от концентрации и времени образом в DF-15 клетках, экспрессирующих Enhanced ProLabel (ePL)-Aiolos, ePL-Ikaros или ePL-ZFP91 после воздействия в течение 1, 2, 6 или 24 часов, причем клетки более чувствительны к Соединению 1, по сравнению с Соединением 2.

[00332] Глубину деградации субстратного белка, описываемую Y -константой, также измеряли в этом анализе в сравнении с ингибитором люциферазы отрицательного контроля (CC1071297, Y -константа = 0). Оба энантиомера показали сходные значения Y -константы (Таблица 9), что соответствует сходным нижним асимптотам Y на кривых ответа на лекарственное средство (фиг. 17).

Таблица 9. Сравнение кинетики деградации субстрата, индуцированной Соединением 1 и его R-энантиомером, в клетках DF15

Субстратный белок	Момент времени (часы)	Соединение 1		Соединение 2	
		EC50 (нМ)	Y-константа	EC50 (нМ)	Y-константа
Ikaros					
	0,75	1,25	39,3	39,7	47,0
	1	1,01	27,5	27,0	34,4
	1,5	0,96	12,5	22,5	15,3
	3	0,81	8,6	8,88	7,3
	4	0,99	6,8	7,31	5,5
	24	0,35	2,6	0,70	2,4
Aiolos					
	0,75	0,73	46	38	54
	1	0,94	29	24	37
	1,5	0,72	11	17	15
	3	0,60	4,8	10	3,5
	4	0,56	3,9	7,3	3,5
	24	0,52	4,0	5,3	3,8
ZFP91					
	0,75	0,54	37	29	41
	1	0,36	28	25	22
	1,5	0,36	11	16	10

	3	0,19	4,9	4,5	4,6
	4	0,17	4,3	2,6	4,1
	24	0,15	2,0	0,35	2,5

EC50 = полумаксимальная эффективная концентрация, ZFP91 = белок «цинковый палец» 91.

[00333] В совокупности эти результаты показали, что уровни Ikaros, Aiolos и ZFP91 могут служить маркерами ответа как на Соединение 1, так и на Соединение 2.

Пример 19. Влияние Соединения 1 на созревание предшественников нейтрофилов

[00334] Влияние Соединения 1 на созревание миелоидных предшественников в нейтрофилы оценивали в *ex vivo* культурах CD34+ клеток костного мозга здоровых доноров, и оценивали различные схемы дозирования, чтобы получить представление о зависимости этих событий от схемы.

[00335] Миелоидную дифференцировку индуцировали добавлением фактора стволовых клеток (SCF), лиганда тирозинкиназы 3, связанной с FMS (FLT3-L), и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) в культуральную среду. Дифференцировку клеток в присутствии или в отсутствии Соединения 1 оценивали в заранее заданные моменты времени с помощью проточной цитометрии как процент клеток в 5 субпопуляциях: (1) гемопоэтические стволовые клетки (HSC, CD34+/CD33-/CD11b-); (2) Клетки стадии I (CD34+/CD33+/CD11b-); (3) Клетки стадии II (CD34-/CD33+/CD11b-); (4) Клетки стадии III (CD34-/CD33+/CD11b+) и (5) Клетки IV стадии (CD34-/CD33-/CD11b+) (от незрелых до зрелых). Дифференцировку и жизнеспособность контролировали во время полного анализа каждые два или три дня.

[00336] Влияние различных периодов воздействия Соединения 1 (14 или 5 дней лечения) на жизнеспособность и созревание миелоидных предшественников в нейтрофилы оценивали при концентрациях 1, 10 и 100 нМ Соединения 1 в указанные моменты времени (фиг. 18. фиг. 19) до 21 дня подряд с использованием проточной цитометрии. Результаты показали, что поздняя стадия созревания предшественников нейтрофилов блокировалась Соединением 1, при этом количество зрелых нейтрофилов значительно снижалось в числе при более высоких концентрациях после 14 (фиг. 19А) или 5 дней (фиг. 19В) воздействия. Задержка созревания, по-видимому, происходит в первую очередь на стадии развития нейтрофилов-предшественников III стадии, о чем свидетельствует накопление клеток с иммунофенотипом клеточной поверхности стадии III и сокращение популяции клеток с иммунофенотипом клеточной поверхности стадии IV

(зрелые нейтрофилы). Однако жизнеспособность предшественников нейтрофилов, подвергшихся воздействию Соединения 1, не изменилась (фиг. 18).

[00337] Восстановление зрелых нейтрофилов после воздействия Соединения 1 также оценивали в системе. После 1-недельного периода без Соединения 1 доля зрелых нейтрофилов (клеток Стадии IV) восстанавливалась по меньшей мере на ~50% от своего наименьшего значения с тенденцией к более быстрому и полному восстановлению при более низких концентрациях (фиг. 20, Таблица 10).

[00338] Уровни белка Ikaros контролировали в течение периодов воздействия Соединения 1 и восстановления. Уровни Ikaros снижались во время воздействия Соединения 1 и восстанавливались после отмены лекарственного времени в зависимости от концентрации, при этом не отмечалось значительных различий в связи с различными схемами воздействия (фиг. 21, фиг. 22). Уровни Ikaros начали возвращаться к норме по меньшей мере через 3 дня после вымывания, до полного восстановления созревания предшественников нейтрофилов на поздних стадиях (фиг. 23). Эти результаты показали, что деградация Ikaros в предшественниках нейтрофилов на поздних стадиях может быть важным медиатором нейтропении у реципиентов Соединения 1. Кроме того, данные свидетельствуют о том, что восстановление уровней Ikaros предшествует восстановлению созревания предшественников нейтрофилов. Соответственно, уровни Ikaros в нейтрофилах могут служить маркером ответа на Соединение 1.

[00339] Восстановление уровней зрелых нейтрофилов по крайней мере до 50% от необработанного контрольного уровня в системе анализа *in vitro*, используемой в настоящем исследовании, коррелирует с отсутствием клинически значимой нейтропении у пациентов. В текущем исследовании после периода в течение одной недели без лекарственных препаратов популяция Клеток стадии IV была способна восстанавливаться зависимым от концентрации образом до уровня, равного по меньшей мере 50% от популяции Клеток стадии IV в контрольном DMSO (фиг. 20) при всех оцененных тестируемых условиях и даже достигала контрольных уровней в DMSO при некоторых тестируемых условиях.

Таблица 10. Количество времени, необходимое для восстановления до 50% клеток стадии IV после непрерывного воздействия Соединения 1 в течение 14 дней или 5 дней с недельным отмыванием после обработки

	Количество дней в периоде отмывания, необходимое для восстановления до 50% клеток стадии IV				
Концентрация Соединения 1	0,1 нМ	1 нМ	10 нМ	100 нМ	1000 нМ
14 дней обработки	0	0	0 to 2	4	4
5 дней обработки	0	1	1	3 to 4	5

[00340] Уровень белка Ikaros анализировали с помощью проточной цитометрии каждые два или три дня. Как показано на фиг. 21 и фиг. 22, белок Ikaros разрушался при обеих схемах обработки Соединением 1 (14 дней и 5 дней), и его экспрессия восстанавливалась после вымывания лекарственного средства зависимым от концентрации образом. На 19-й день наблюдалось полное восстановление Ikaros при всех концентрациях после 14 дней обработки. Восстановление экспрессии белка Ikaros было медленнее в клетках, обработанных в течение 5 дней, чем в клетках, обработанных в течение 14 дней: на 19-й день восстановление белка Ikaros не было полным при любой концентрации Соединения 1, а на 21-й день уровень белка Ikaros полностью восстанавливался в культурах, подвергнутых воздействию только 10 нМ Соединения 1.

[00341] В текущем исследовании, как показано на фиг. 23 в клетках, подвергавшихся воздействию Соединения 1 в течение 14 дней, контрольные уровни Ikaros возвращались к уровням восстановления дифференцировки предшественников нейтрофилов. При концентрациях Соединения 1 от 10 до 1000 нМ восстановление созревания предшественников нейтрофилов происходило медленнее, чем восстановление уровней белка Ikaros.

[00342] В совокупности эти результаты показали, что уровни белка Ikaros в миелоидных клетках, а также апоптоз и миелоидная дифференцировка в клетках CD34+ могут служить маркерами ответа на Соединение 1.

[00343] Описанные выше варианты осуществления предназначены только для примера, и для специалистов в данной области техники известны или возможны, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, веществ и процедур. Все такие эквиваленты рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения и охватываются прилагаемой формулой изобретения.

Пример 20. Маркеры ответа на Соединение 1 идентифицировали с помощью интегрированного анализа транскриптомного и протеомного профилей

[00344] Биомаркеры, связанные с цитотоксическими эффектами обработки Соединением 1 в DLBCL, такие как сигнальные и регуляторные пути, определяли с помощью интегративного сетевого анализа с использованием транскриптомного и протеомного профилирования. Подход состоял из оптимизации сетевого потока с использованием магистральной сети, основанной на знаниях, с взаимодействиями белков и регуляторными ассоциациями, аналогичными тому, что было описано ранее (Basha, Mauer, Simonovsky, Shpringer, & Yeger-Lotem, 2019; Gosline, Spencer, Ursu, & Fraenkel, 2012).

[00345] Кратко, анализ дифференциальной экспрессии и анализ дифференциального содержания белка в разные моменты времени были объединены с использованием модельной структуры. Эта сеть представляет собой трехчастный граф, который включает уровни сети белок-белкового взаимодействия (PPi), уровни сети регуляции транскрипции и определения путей, собранные из следующих источников:

- Регуляторная сеть транскрипции (TRN)
 - Собственные сигнатуры генов IKZF3 и ZFP91, и ReMAP (492 TFs) (Chèneby, Gheorghe, Artufel, Mathelier, & Ballester, 2018)
 - Пики ChIP-Seq, аннотированные к сайтам начала транскрипции (TSS) и отфильтрованные по близости ($TSS \pm 2\text{kbp}$)
 - TRN на основе 436 факторов транскрипции и 21 633 генов (размеры регулонов $\in [10, 7500]$)
- Сеть белок-белкового взаимодействия (PPiN)
 - Интеграция ПОДСКАЗКИ (Das & Yu, 2012), H-II-14 (Rolland *et al.*, 2014), Комплексы растворимых белков человека (Ruepp *et al.*, 2010) & BioPlex (Huttlin *et al.*, 2015) и фильтрация по экспериментальным данным с высокой степенью достоверности
 - 13872 белка $\times$ 144344 ребра (с учетом направленности)
- Пути от MSigDB-C2 v6.1
 - 8904 гена $\times$ 1329 путей (Subramanian *et al.*, 2005)

[00346] Емкость ребра была взвешена гармоническим средним значением π (Xiao *et al.*, 2014) как стандартизированное логарифмическое 2-кратное изменение по сравнению с анализом дифференциальной экспрессии и содержанием белка, упорядоченным по $\log_{10}$ р-значениям для каждой пары партнеров по взаимодействию. Баллы были стандартизированы и масштабированы между -1 и 1.

[00347] Расчет потока был выполнен с использованием метода максимального потока, реализованного в graph.maxflow компании Bioconductor. Был реализован итеративный процесс для фильтрации наименее релевантных взаимодействий при сохранении значительного объема потока, проходящего через сеть. Ребра с потоком ниже 5-го квантиля удалялись на каждой итерации, а пути, отсоединенные от источника/приемника, обрезались до тех пор, пока не удовлетворялись критерии оптимизации.

[00348] Для начала чувствительность клеточной линии к Соединению 1 определяли с помощью проточной цитометрии для 40 моделей клеточных линий с использованием окрашивания DRAQ7 и аннексином V для количественной оценки снижения пролиферации и индукции апоптоза после пяти дней обработки соединением. Строили кривые зависимости от дозы и вычисляли площадь под кривыми (AUC) для каждой клеточной линии. Чувствительность рассчитывали путем расчета отношения (AUCapoptosis/AUClive клеток), где меньшие отношения указывали на устойчивость, а большие отношения указывали на чувствительность. Было обнаружено, что панель из 11 клеточных линий DLBCL имеет различную чувствительность к обработке Соединением 1 в диапазоне от резистентной до чувствительной.

[00349] Затем 11 клеточных линий DLBCL, охватывающих широкий диапазон спектра чувствительности к Соединению 1, подвергали воздействию 0,04 мкМ Соединения 1 или контроля DMSO, и получали профили протеомики (TMT-MC) и экспрессии генов (RNA-Seq) в трех повторениях для панели. Образцы были профилированы в пяти временных точках после воздействия: 6 и 18 часов для протеомики, и 12, 24 и 48 часов для профилей транскриптомики. Схема динамической интеграции протеомной и транскриптомной информации показана фиг. 24. Комплексный механистический анализ показал, что обработка Соединением 1 вызывала стимулированное Ikaros/Aiolos усиление регуляции генов, связанных с передачей сигналов интерферона (например, IL6ST, IFITM3, IFI6, OAS3, передачей сигналов интерферона α/β), передачей сигналов цитокинов/хемокинов (например, IL23A, CCL1), апоптозом (например, IL27, TNF, IL10, каспаза), клеточной адгезией (например, SELE, SELPLG, TXA2), межклеточными соединениями (например, CLDN7, CLDN12), рецепторами, связанными с G-белком (например, FFAR2), внеклеточным матриксом (например, CD209, SERPINA, SERPINB7), и глобальное подавление генов, связанных с клеточным циклом и транскрипцией. Сводка различных путей, вовлеченных в чувствительность к Соединению 1, и генов, связанных с путями, показана на фиг. 25. В частности, было обнаружено, что несколько генов связаны с цитотоксическими эффектами Соединения 1, что демонстрирует, что активация этих

генов может служить биомаркерами ответа на Соединение 1 при DLBCL. Этот список включает гены, связанные с интерфероном и хемокинами (например, IL23A, CCL2, IFITM3), гены клеточной адгезии (например, CLDN7), гены передачи сигналов GPCR и гены, связанные с апоптозом (например, TNF). Например, сравнительное представление о кратности изменений типичных генов, таких как IL23A (фиг. 26A), CCL2 (фиг. 26B) и SRGAP1 (фиг. 26C), в разные моменты времени и в разных моделях клеточных линий показало повышенную модуляцию этих маркеров в клеточных линиях, где цитотоксические эффекты являются более сильными, было обнаружено, что они связаны с чувствительностью к обработке Соединением 1. Кроме того, сравнение протеомных результатов, измеренных через 6 и 18 часов, показало, что дифференциальная экспрессия белков может быть связана с чувствительностью к обработке Соединением 1 (фиг. 27). Например, было обнаружено, что уровни белков генов, таких как IKZF3, IKZF1, ZFP91, ETS1, MNT, MEF2B, SNAPC1, KDM4B, TFAP4, UBTF, BAH1D1, MBD4, CBX2, TP63, TLE3, FOXO1, ZBTB11, IRF4, MED26, ATF7, ZNF644, KDM5B, USF2, TCF25, KDM4A, L3MBTL2, SNAPC4, KDM5, EBF1, FOXJ2, NFATC1, ZFP36, HDGF, ELF1, PML, MYBL2, SMAD2, CHD2, STAT1, PAX5, STAT2, PYGO2, IRF9, PCGF2 и ATF3, изменялись в ответ на обработку Соединением 1, при этом более значительные изменения наблюдали через 18 часов обработки, по сравнению с 6 часами обработки.

[00350] В совокупности эти результаты продемонстрировали, что активация генов, связанных с передачей сигналов интерферона, цитокинов/хемокинов, апоптозом и клеточной адгезией, и глобальное подавление генов, связанных с клеточным циклом и транскрипцией, могут служить биомаркерами чувствительности к обработке Соединением 1. В частности, иллюстративные гены, такие как IL23A, CCL2, IFITM3, CLDN7, TNF и SRGAP1, могут служить биомаркерами чувствительности к обработке Соединением 1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

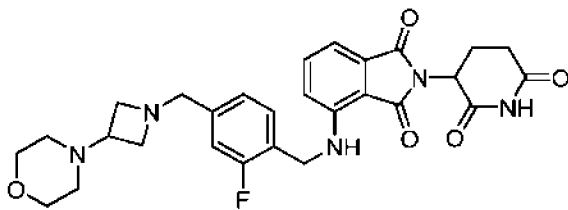
1. Способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающий:

- (a) взятие образца у субъекта,
- (b) определение уровня биомаркера в образце,
- (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения,

если:

- (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или
- (ii) уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера, и

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ селективного лечения гематологической злокачественной опухоли у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, предусматривающий:

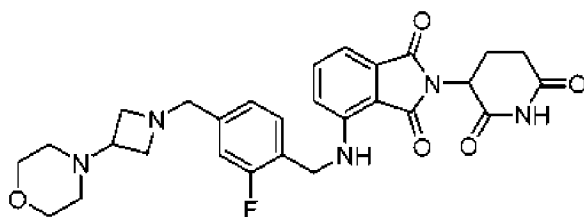
- (a) взятие образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью,
- (b) определение уровня биомаркера в образце,
- (c) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения,

если:

- (i) уровень биомаркера в образце является обнаруживаемым, или
- (ii) уровень биомаркера представляет собой измененный уровень

относительно контрольного уровня биомаркера, и

- (d) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, диагностированному как вероятно отвечающий на соединение для лечения, где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п. 1 или 2, где биомаркер представляет собой цереблон (CRBN), и где способ предусматривает диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если CRBN является обнаруживаемым или выше контрольного уровня в образце.

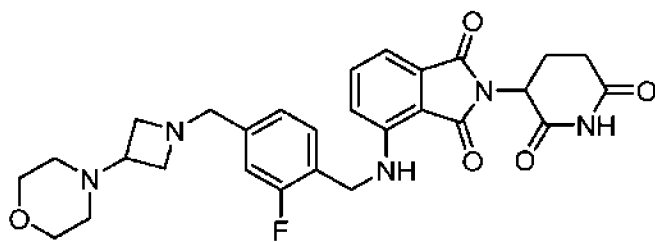
4. Способ по п. 1 или 2, где биомаркер представляет собой Ikaros, Aiolos, ZFP91 или их комбинацию, и где способ предусматривает диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце ниже контрольного уровня.

5. Способ по п. 4, где биомаркер представляет собой комбинацию Ikaros и Aiolos, и где способ предусматривает диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень как Ikaros, так и Aiolos ниже их соответствующих контрольных уровней.

6. Способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающий:

- (a) взятие образца у субъекта,
- (b) введение соединения для лечения в образец,
- (c) определение уровня биомаркера в образце, и
- (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



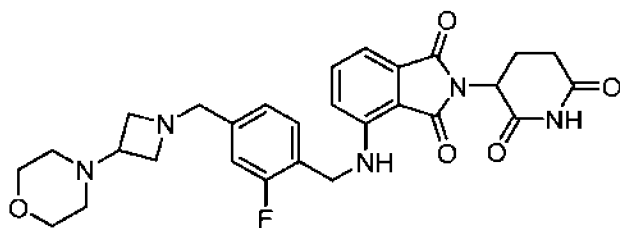
(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

7. Способ идентификации субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, который вероятно будет отвечать на соединение для лечения, или прогноза отвечаемости субъекта, страдающего или потенциально страдающего гематологической злокачественной опухолью, на соединение для лечения, предусматривающий:

- (a) введение соединения для лечения субъекту,
- (b) взятие образца у субъекта,
- (c) определение уровня биомаркера в образце, и
- (d) диагностирование субъекта как вероятно отвечающего на соединение для лечения, если уровень биомаркера в образце представляет собой измененный уровень относительно контрольного уровня биомаркера,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

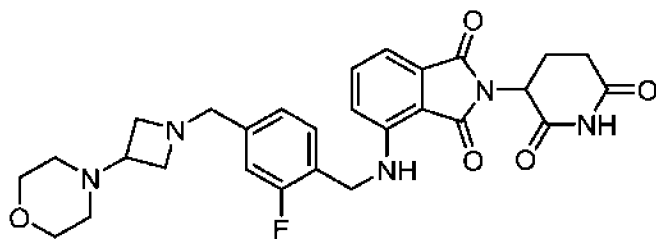
или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

8. Способ контроля эффективности соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта, предусматривающий:

- (a) введение соединения для лечения субъекту,
 - (b) взятие образца у субъекта,
 - (c) определение уровня биомаркера в образце, и
 - (d) сравнение уровня биомаркера в образце с контрольным уровнем биомаркера,
- где измененный уровень биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения

при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



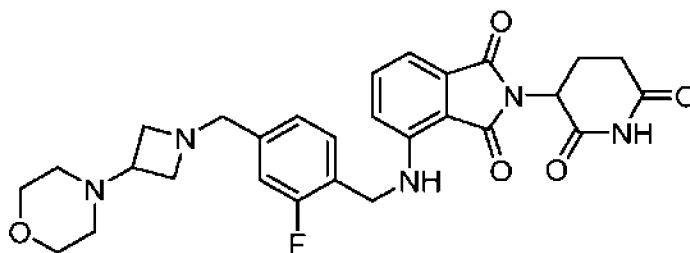
(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ установления количества или частоты введения дозы для лечения субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью, соединением для лечения, предусматривающий:

- (a) введение дозы соединения для лечения субъекту,
- (b) взятие одного или нескольких образцов у субъекта в различные моменты времени, и
- (c) контроль уровня биомаркера в одном или нескольких образцах, и
- (d) установление дозы для последующего введения соединения для лечения на основе измененного уровня биомаркера в контрольном образце,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

10. Способ по любому из пп. 6 - 9, дополнительно предусматривающий введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту, диагностированному как вероятно отвечающий на соединение для лечения.

11. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где измененный уровень биомаркера в образце выше контрольного уровня биомаркера.

12. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где измененный уровень биомаркера в

образце ниже контрольного уровня биомаркера.

13. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где повышенный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта.

14. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где а пониженный уровень биомаркера относительно контрольного уровня биомаркера указывает на эффективность соединения для лечения при лечении гематологической злокачественной опухоли у субъекта.

15. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у субъекта перед введением соединения для лечения субъекту, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец.

16. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где контрольный уровень биомаркера представляет собой уровень биомаркера в контрольном образце, взятом у здорового субъекта, не страдающего гематологической злокачественной опухолью, и где контрольный образец происходит из того же источника, что и образец.

17. Способ по любому из пп. 1, 2 и 6 - 10, где контрольный уровень биомаркера представляет собой заранее определенный уровень биомаркера.

18. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит маркер апоптоза, и где изменение уровня биомаркера является показателем индукции апоптоза.

19. Способ по п. 18, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из расщепляющей каспазы 3, расщепляющей каспазы 7, расщепленной поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), BCL2, сурвивина, фосфатидилсерина (PS) и ДНК, Bcl-2-подобного белка 11 (BIM), фактора некроза опухоли (TNF), интерлейкин-10 (IL-10) и интерлейкин-27 (IL27) или их комбинации.

20. Способ по п. 19, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

21. Способ по п. 19, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

22. Способ по п. 18, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из Аннексин-V, 7-амино-актиномицина D (7-AAD) и ярко-красного антрахинона 7 (DRAQ7) или их комбинации.

23. Способ по п. 22, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

24. Способ по п. 22, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

25. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из IL-8, IL-1a, sPGE2, sTNF α , sIgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, коллаген-I и - III, PAI-1, CD69 и sIL-10 или их комбинации.

26. Способ по п. 25, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

27. Способ по п. 25, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.
28. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с передачей сигнала интерферона.
29. Способ по п. 28, где биомаркер содержит сигнальный трансдуктор интерлейкина-6 (IL6ST), интерферон-индуцируемый трансмембранный белок 3 (IFITM3), интерферон альфа-индуцируемый белок 6 (IFI6), 2'-5'-олигоденилатсинтазу 3 (OAS3), интерферон α (IFN α), интерферон β (IFN β) или их комбинацию.
30. Способ по п. 28 или 29, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.
31. Способ по п. 28 или 29, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.
32. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с передачей сигнала цитокина/хемокина.
33. Способ по п. 32, где биомаркер содержит субъединицу альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 1 (CCL1) или их комбинацию.
34. Способ по п. 32 или 33, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.
35. Способ по п. 32 или 33, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.
36. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с клеточной адгезией.
37. Способ по п. 36, где биомаркер содержит E-селектин (SELE), гликопротеиновый лиганд P-селектина 1 (SELPLG), тромбоксан A2 (TXA2) или их комбинацию.
38. Способ по п. 36 или 37, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.
39. Способ по п. 36 или 37, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.
40. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с межклеточным соединением.
41. Способ по п. 40, где биомаркер содержит клаудин 7 (CLDN7), клаудин 12 (CLDN12) или их комбинацию.
42. Способ по п. 40 или 41, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.
43. Способ по п. 40 или 41, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.
44. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер представляет собой сопряженный

с G-белком рецептор.

45. Способ по п. 44, где биомаркер содержит рецептор свободной жирной кислоты 2 (FFAR2).

46. Способ по п. 44 или 45, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

47. Способ по п. 44 или 45, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

48. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с внеклеточным матриксом.

49. Способ по п. 48, где биомаркер содержит CD209, SERPINA, SERPINB7 или их комбинацию.

50. Способ по п. 48 или 49, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

51. Способ по п. 48 или 49, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

52. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с клеточным циклом.

53. Способ по п. 52, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

54. Способ по п. 52, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

55. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер связан с транскрипцией.

56. Способ по п. 55, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

57. Способ по п. 55, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

58. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит один или несколько белков, выбранных из группы, состоящей из Aiolos (IKZF3), Ikaros (IKZF1), E3 убиквитинпротеинлигазы ZFP91 (ZFP91), белка C-ets-1 (ETS1), Мах-связывающего белка MNT (MNT), миоцит-специфического энхансерного фактора 2B (MEF2B), субъединицы 1 snRNA-активирующего белкового комплекса (SNAPC1), лизин-специфической деметилазы 4B (KDM4B), фактора транскрипции AP-4 (TFAP4), ядерного фактора транскрипции 1 (UBTF), белка 1, содержащего смежный гомологичный бромодомен (BAND1), белка 4, содержащего метил-СрG-связывающий домен 4 (MBD4), гомолога белка хромобокса 2 (CBX2), опухолевого белка 63 (TP63), трансдуцин-подобного белка энхансера 3 (TLE3), белка forkhead box P1 (FOXP1), белка 11, содержащего цинковый палец и домен BTB (ZBTB11), регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), медиатора субъединицы транскрипции РНК-полимеразы II 26 (MED26), циклический АМР-зависимого фактора транскрипции ATF-7 (ATF7), белка 644 цинкового пальца (ZNF644), лизин-специфической деметилазы 5B (KDM5B), вышестоящего стимулирующего фактора 2 (USF2), фактора транскрипции 25 (TCF25), лизин-специфической деметилазы 4A (KDM4A), летального (3)

белка 2, подобного злокачественной опухоли головного мозга (L3MBTL2), субъединицы 4 яРНК-активирующего белкового комплекса (SNAPC4), лизин-специфической деметилазы 5 (KDM5), фактора транскрипции COE1 (EBF1), белка forkhead box J2 (FOXJ2), ядерного фактора активированных Т-клеток, цитоплазматического 1 (NFATC1), белка-активатора распада мРНК ZFP36 (ZFP36), происходящего из гепатомы фактора роста (HDGF), ETS-связанного фактора транскрипции Elf-1 (ELF1), белка промиелоцитарного лейкоза (PML), Myb-связанного белка В MYBL2, матери против декапентегического гомолога 2 (SMAD2), хромодомен-ДНК-хеликаза-связывающего белка 2 (CHD2), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 1 (STAT1), белка paired box Pax-5 (PAX5), сигнального трансдуктора и активатора транскрипции 2 (STAT2), гомолога pycopus 2 (PYGO2), регуляторного фактора интерферона 9 (IRF9), белка 2 кольцевого пальца группы polycomb (PCGF2) и циклический АМР-зависимого фактора транскрипции ATF-3 (ATF3).

59. Способ по п. 58, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

60. Способ по п. 58, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

61. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из субъединицы альфа интерлейкина-23 (IL23A), хемокинового (С-С мотив) лиганда 2 (CCL2) и SLIT-ROBO Rho GTPаза-активирующего белка 1 (SRGAP1).

62. Способ по п. 61, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

63. Способ по п. 61, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

64. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит CRBN-ассоциированный белок или мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка.

65. Способ по п. 64, где CRBN-ассоциированный белок выбирают из группы, состоящей из IKAROS, AIOLOS и ZFP91.

66. Способ по п. 64, где мишень транскрипции CRBN-ассоциированного белка выбирают из группы, состоящей из BCL6, c-MYC и IRF4.

67. Способ по п. 65 или 66, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

68. Способ по п. 65 или 66, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

69. Способ по п. 64, где биомаркер содержит интерферон-индуцируемый ген.

70. Способ по п. 69, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из регуляторного фактора интерферона 7 (IRF7), интерферон-индуцированного белка с тетраатрикопептидными повторами 3 (IFIT3), белка DEAD box 58 (DDX58) и их комбинации.

71. Способ по п. 69 или 70, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

72. Способ по п. 69 или 70, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

73. Способ по п. 64, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из ингибитора циклинзависимой киназы 1 (p21).

74. Способ по п. 73, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

75. Способ по п. 73, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

76. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит маркер Т-клеточной активации.

77. Способ по п. 76, где маркер Т-клеточной активации содержит цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией.

78. Способ по п. 77, где цитокин, ассоциированный с Т-клеточной активацией, содержит интерлейкин 2 (IL-2).

79. Способ по любому из пп. 76 - 78, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

80. Способ по любому из пп. 76 - 78, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

81. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит PD1 и LAG3.

82. Способ по п. 81, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

83. Способ по п. 81, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

84. Способ по любому из пп. 6 - 10, где биомаркер содержит эффекторный цитокин или эффекторный хемокин.

85. Способ по п. 84, где биомаркер выбирают из группы, состоящей из гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора некроза опухоли альфа (TNF α), интерферона-гамма (IFN γ) и их комбинации.

86. Способ по п. 84 или 85, где биомаркер в образце выше контрольного уровня биомаркера.

87. Способ по п. 84 или 85, где биомаркер в образце ниже контрольного уровня биомаркера.

88. Способ по любому из пп. 1 - 87, где биомаркер экспрессируется в белом кровяном тельце.

89. Способ по п. 88, где белое кровяное тельце содержит лимфоидную клетку.

90. Способ по п. 89, где лимфоидная клетка содержит Т-клетку.

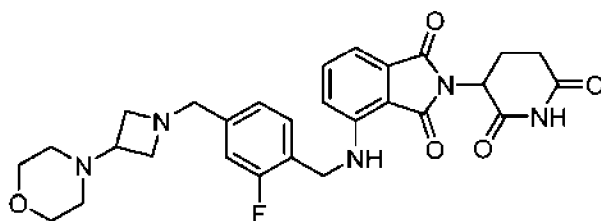
91. Способ лечения гематологической злокачественной опухоли,

предусматривающий:

- (a) получение первого образца у субъекта, страдающего гематологической злокачественной опухолью,
- (b) определение уровня биомаркера в первом образце,
- (c) введение терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту,
- (d) получение по меньшей мере одного дополнительного образца у субъекта после лечения и
- (e) определение уровня биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце, и

если уровень биомаркера в по меньшей мере одном дополнительном образце находится при или около уровня биомаркера первого образца, тогда введение другого терапевтически эффективного количества соединения для лечения субъекту,

где соединение для лечения представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

- 92. Способ по п. 91, где биомаркер содержит Ikaros .
- 93. Способ по п. 92, где биомаркер экспрессируется в белом кровяном тельце.
- 94. Способ по п. 93, где белое кровяное тельце содержит миелоидную клетку.
- 95. Способ по п. 94, где миелоидная клетка содержит нейтрофил.
- 96. Способ по п. 91, где биомаркер содержит нейтрофилы, имеющие фенотип CD11b^+ , CD34^- и CD33^- .

97. Способ по любому из пп. 1 - 96, где соединение содержит (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соли.

98. Способ по любому из пп. 1 - 96, где соединение содержит (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его таутомер, изотополог или

фармацевтически приемлемую соль.

99. Способ по любому из пп. 1 - 96, где соединение содержит смесь (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона и (R)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона или их таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

100. Способ по любому из пп. 1 - 99, дополнительно предусматривающий введение терапевтически эффективного количества второго активного агента или поддерживающей терапии.

101. Способ по п. 100, где второй активный агент выбирают из группы, состоящей из ингибитора HDAC (например, панобиностат, ромидеписин, вориностат или цитариностат), ингибитора BCL2 (например, венетоклакс), ингибитора ВТК (например, ибрутиниб или акалабрутиниб), ингибитора mTOR (например, эверолимус), ингибитора PI3K (например, иделалисиб), ингибитора PKC β (например, энзастаурин), ингибитора SYK (например, фостаматиниб), ингибитора JAK2 γ (например, федраитниб, пакритиниб, руксолитиниб, барицитиниб, гандотиниб, лестауртиниб или момелотиниб), ингибитора киназы Auroга A (например, алисертиб), ингибитора EZH2 (например, таземетостат, GSK126, CPI-1205, 3-деазанепланоцин A, EPZ005687, EI1, UNC1999 или синефунгин), ингибитора BET (например, бирабресиб или 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он), гипометилирующего агента (например, 5-азациитидин или децитабин), химиотерапевтического средства (например, бендамустин, доксорубицин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, ифосфамид, мелфалан, дексаметазон или оксалиплатин), анти-CD20 моноклонального антитела (например, ритуксимаб или обинутумаб), эпигенетического соединения или их комбинации.

102. Способ по п. 101, где второй активный агент содержит ритуксимаб.

103. Способ по п. 101, где второй активный агент содержит обинутумаб.

104. Способ по любому из пп. 1 - 103, где гематологическая злокачественная опухоль поражает гематopoэтические или лимфоидные ткани.

105. Способ по любому из пп. 1 - 104, где гематологическая злокачественная опухоль содержит неходжкинскую лимфому.

106. Способ по п. 105, где неходжкинская лимфома содержит диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL).

107. Способ по п. 106, где DLBCL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

108. Способ по п. 104, где гематологическая злокачественная опухоль содержит хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную содержит (CLL/SLL).

109. Способ по п. 108, где CLL/SLL рецидивирует, невосприимчива или резистентна к обычной терапии.

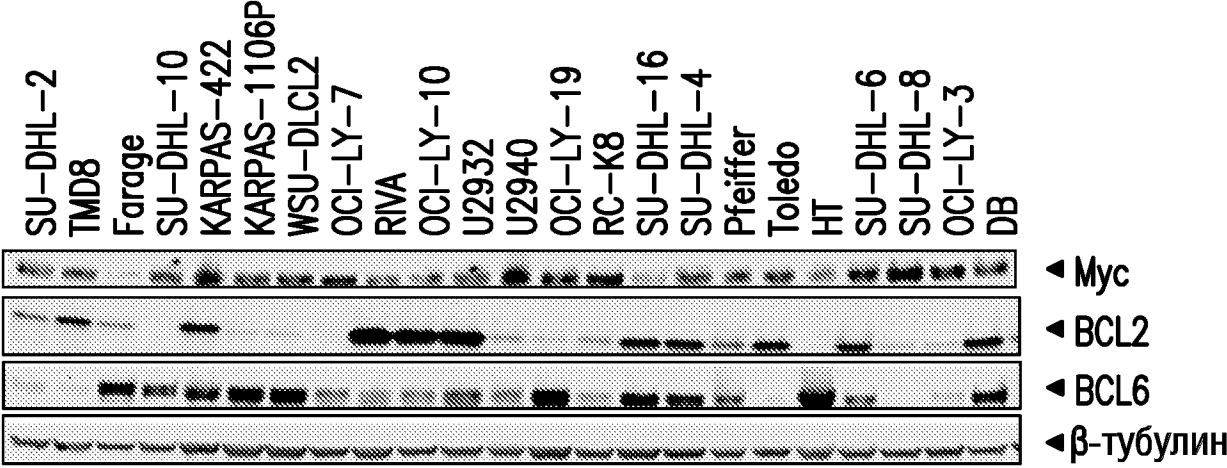
110. Способ по любому из пп. 1 - 109, где образец содержит гематологическую злокачественную опухолевую клетку.

111. Способ по любому из пп. 1 - 110, где определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня белка биомаркера.

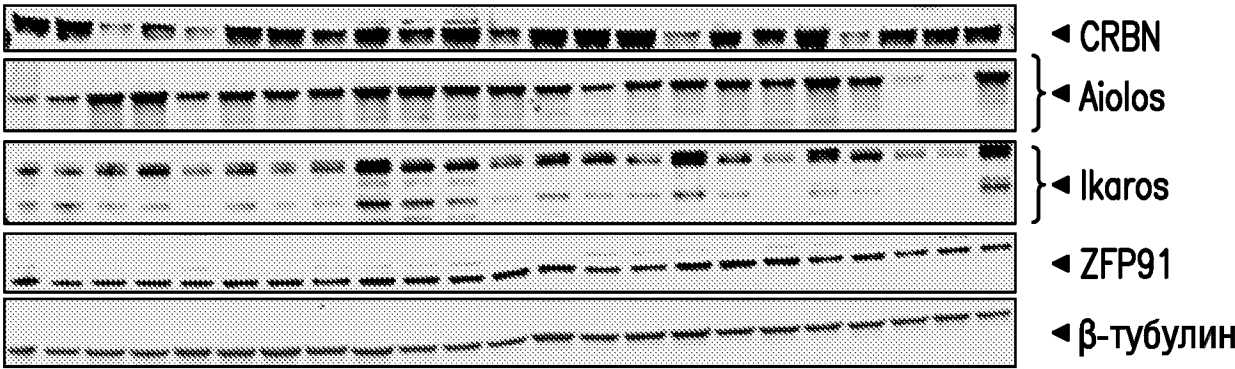
112. Способ по любому из пп. 1 to 110, где определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня мРНК биомаркера.

113. Способ по любому из пп. 1 - 110, где определение уровня биомаркера предусматривает определение уровня кДНК биомаркера.

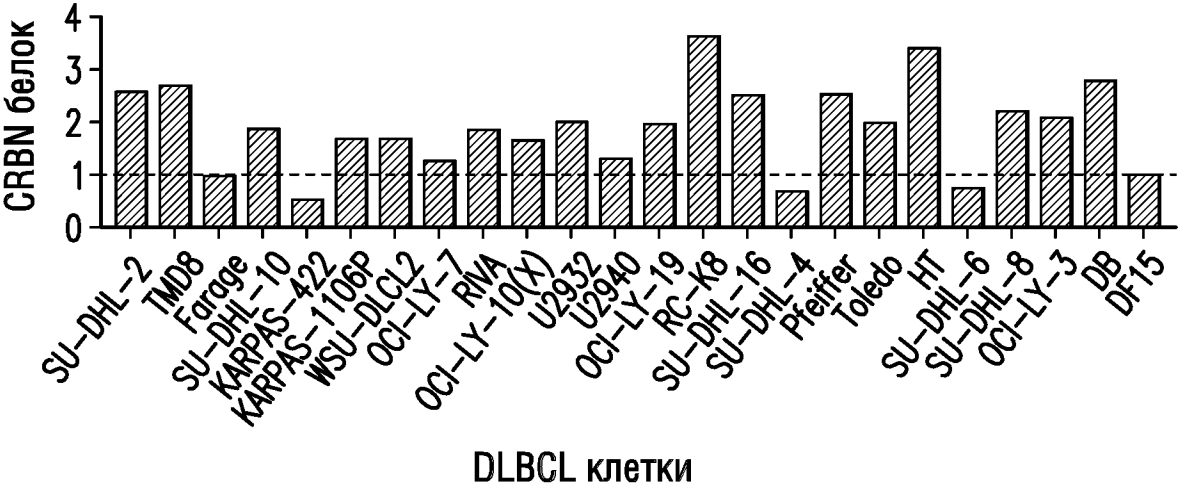
ФИГ.1А



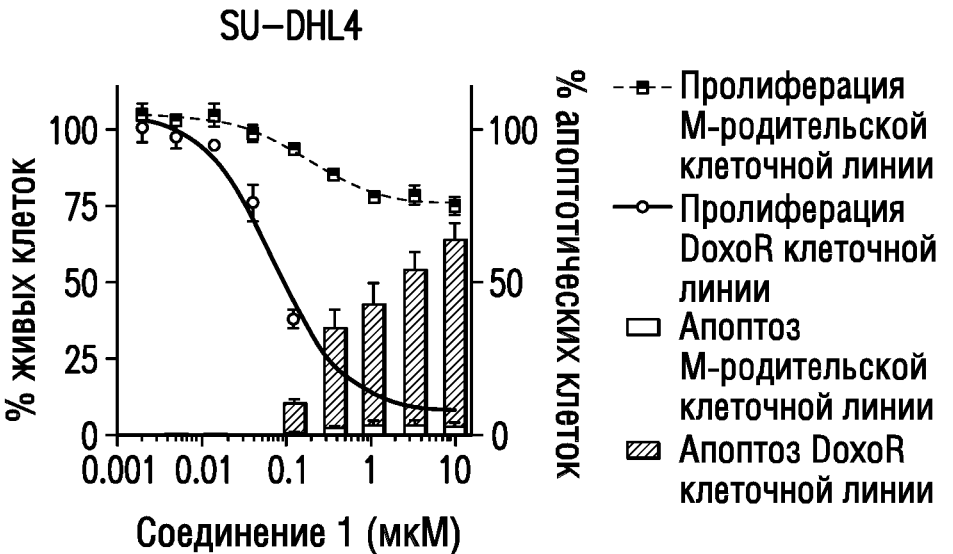
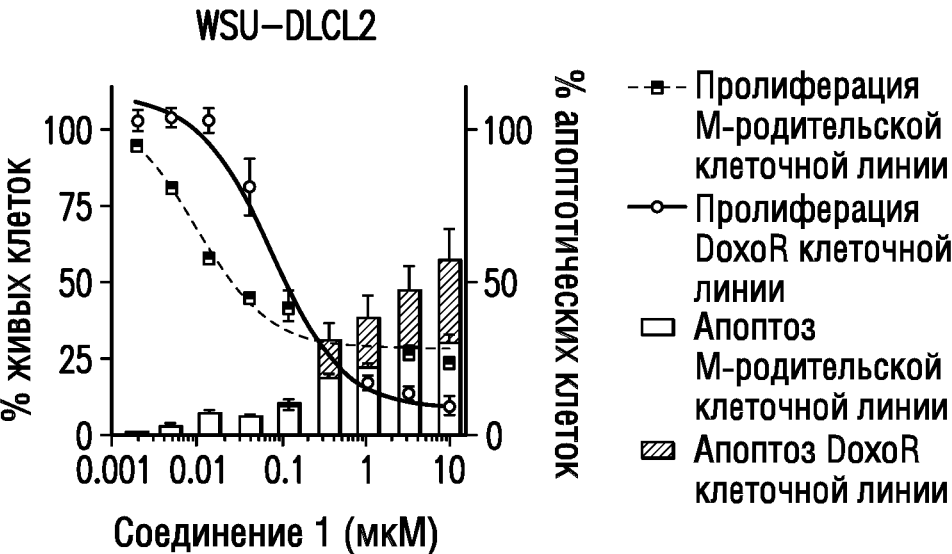
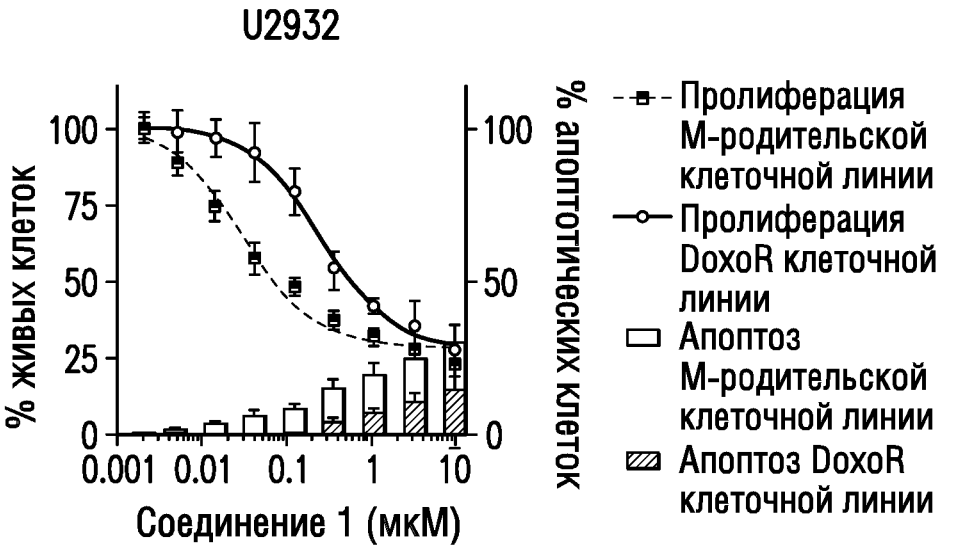
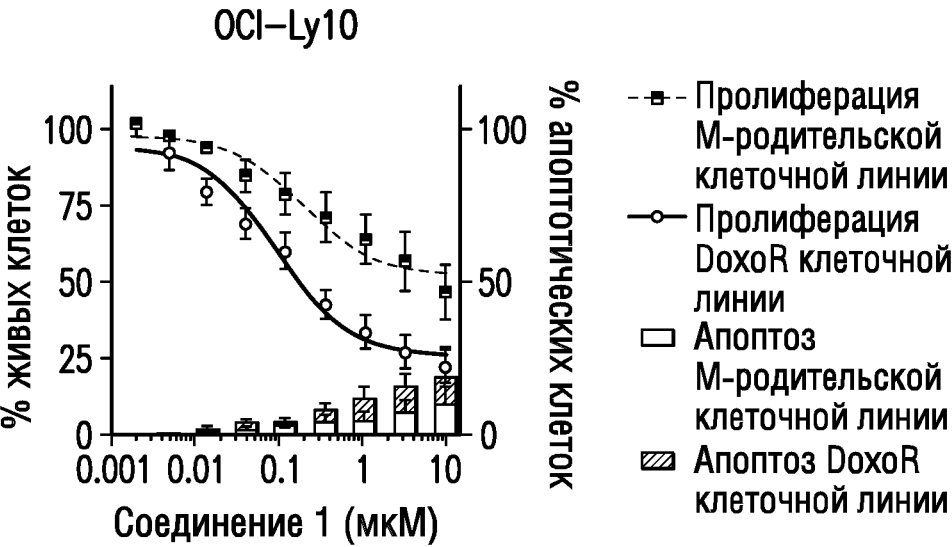
ФИГ.1В



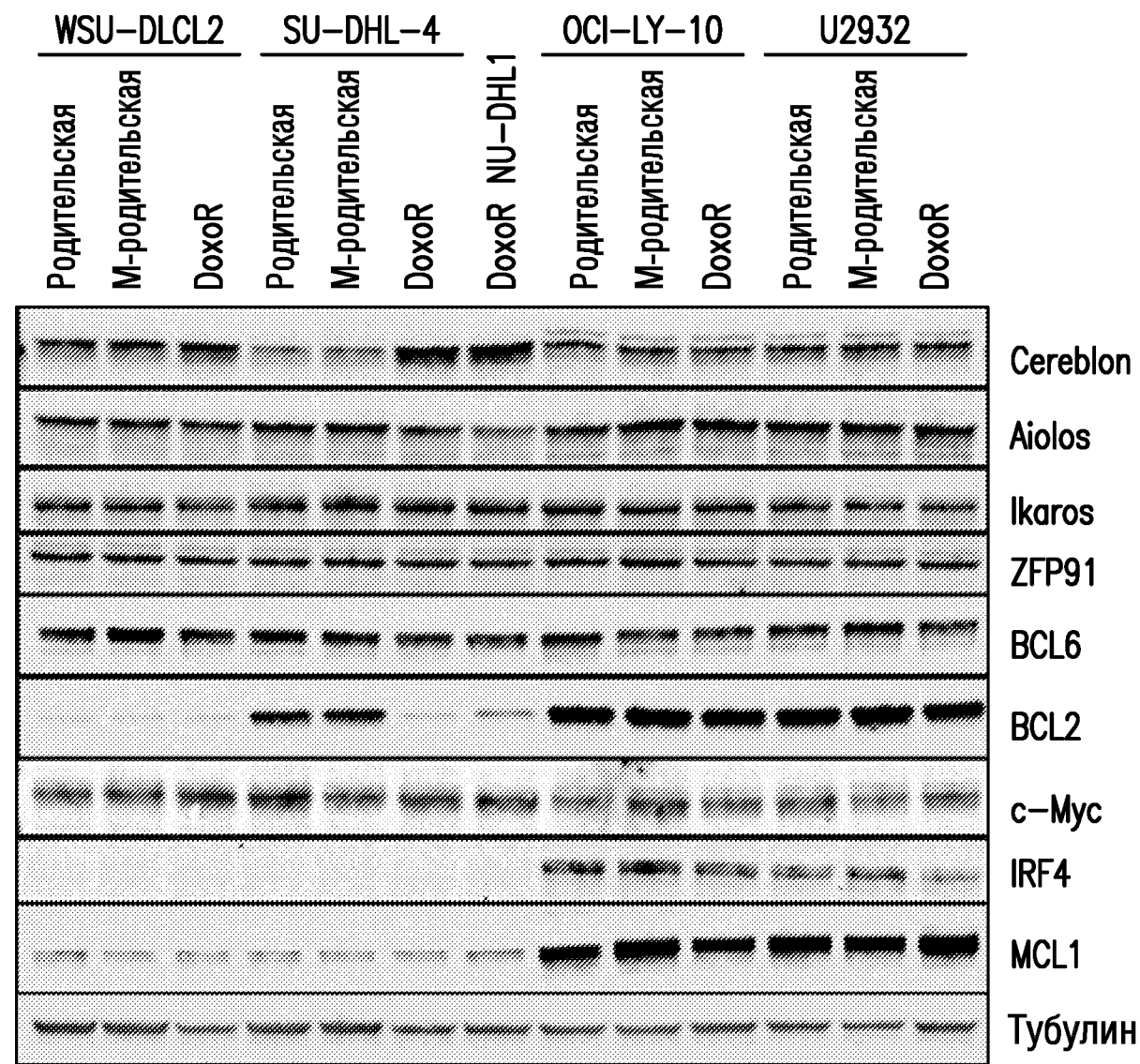
ФИГ.1С



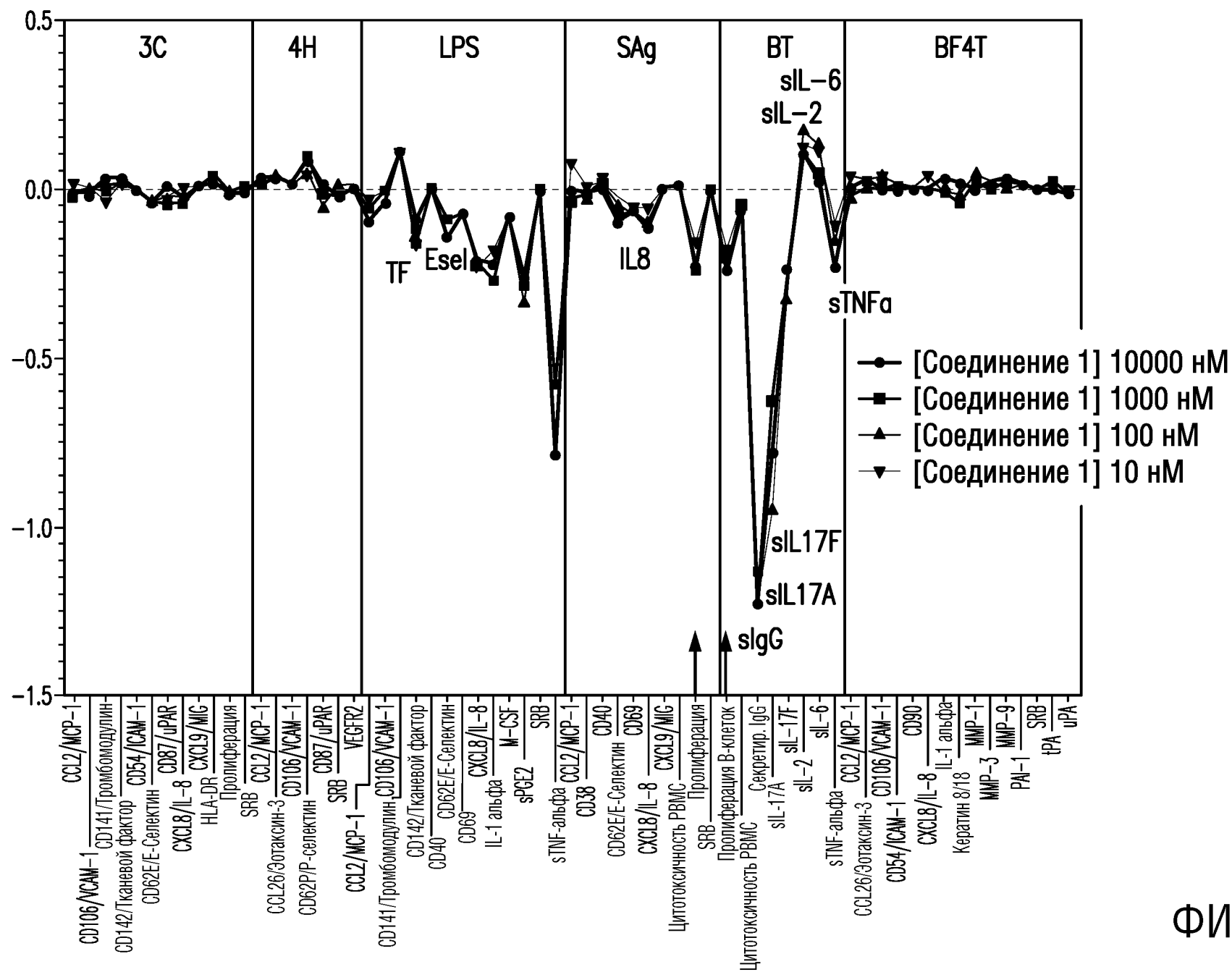
ФИГ.2



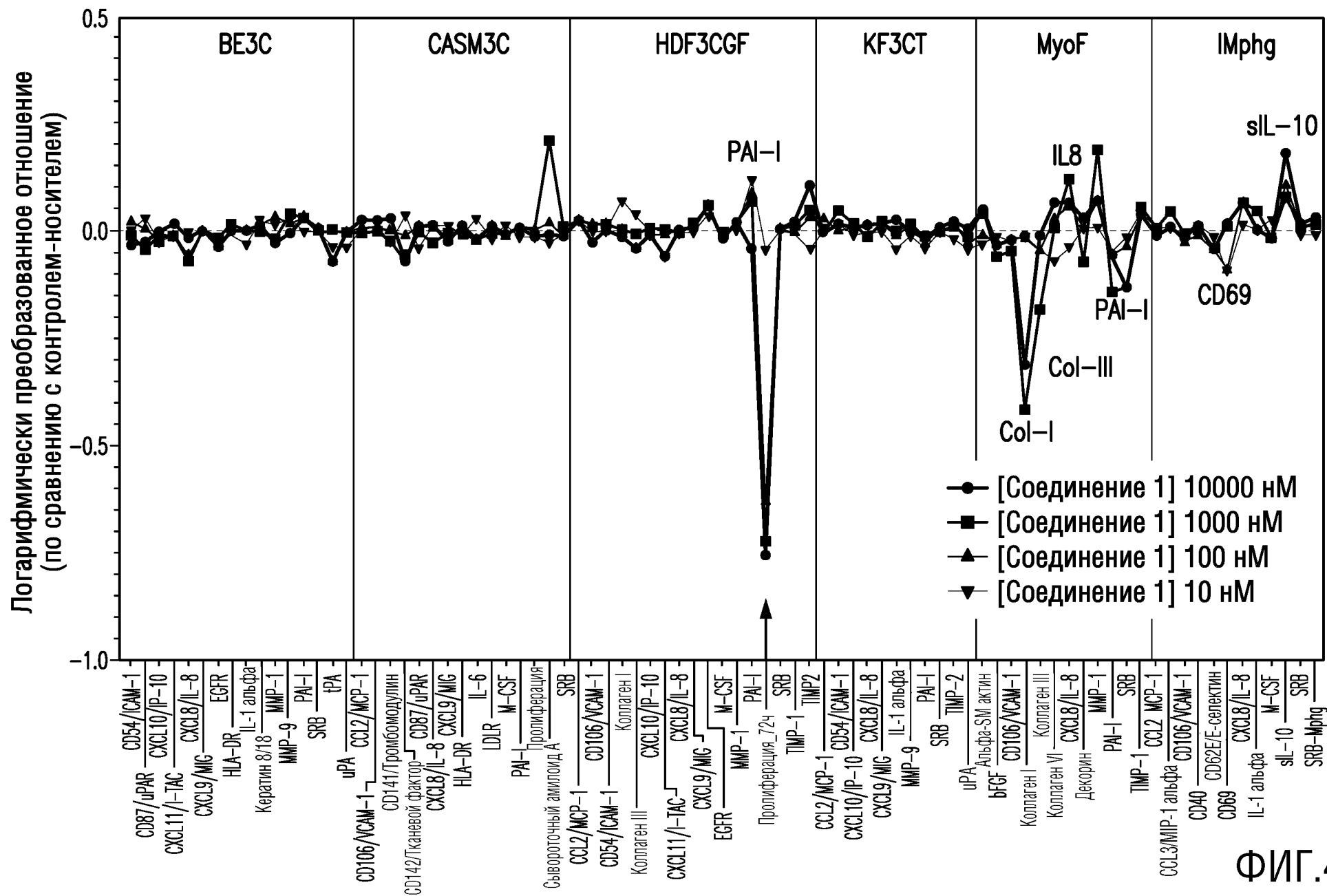
ФИГ.3



Логарифмически преобразованное отношение
(по сравнению с контролем-носителем)

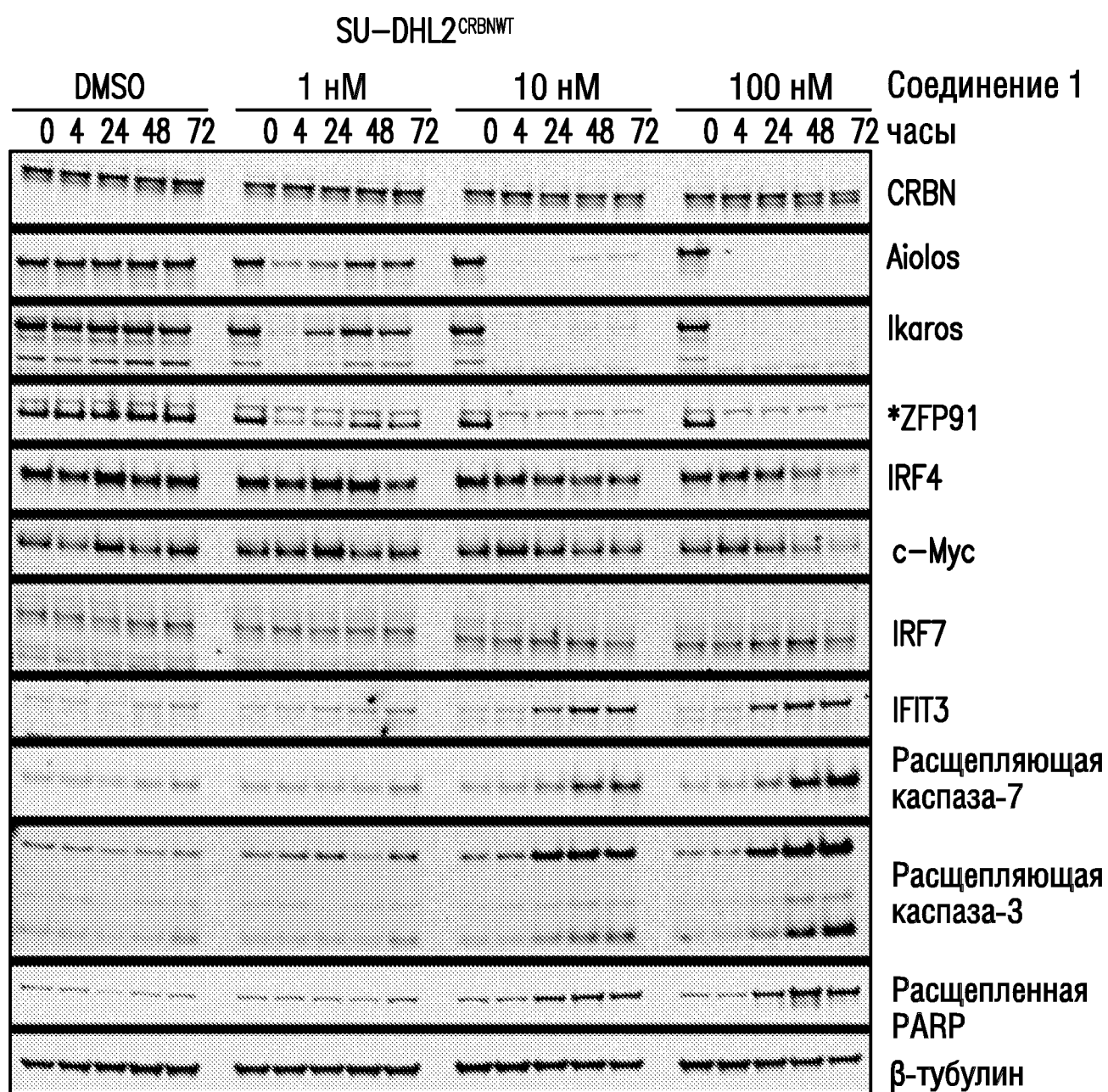


ФИГ.4А

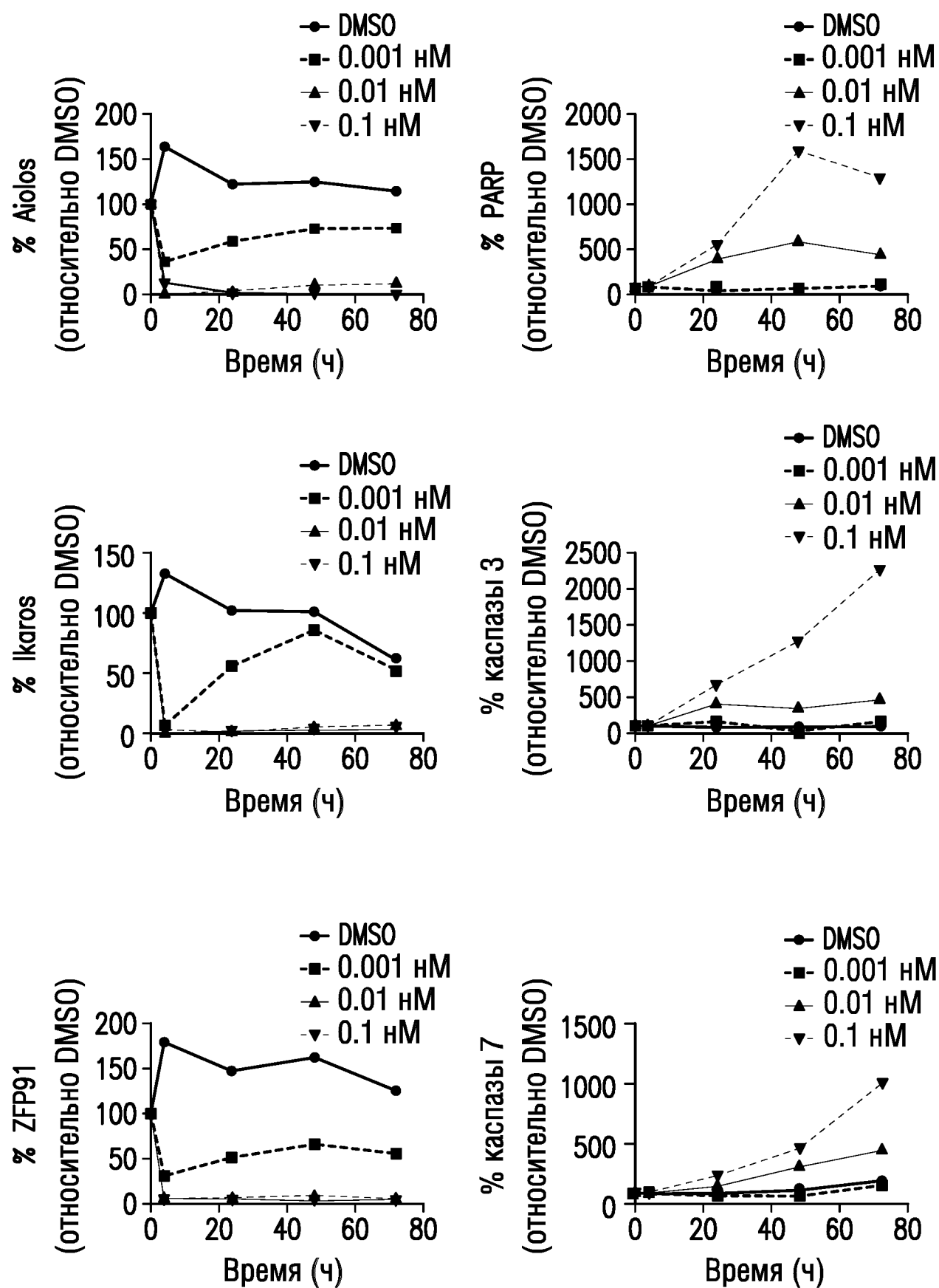


ФИГ.4В

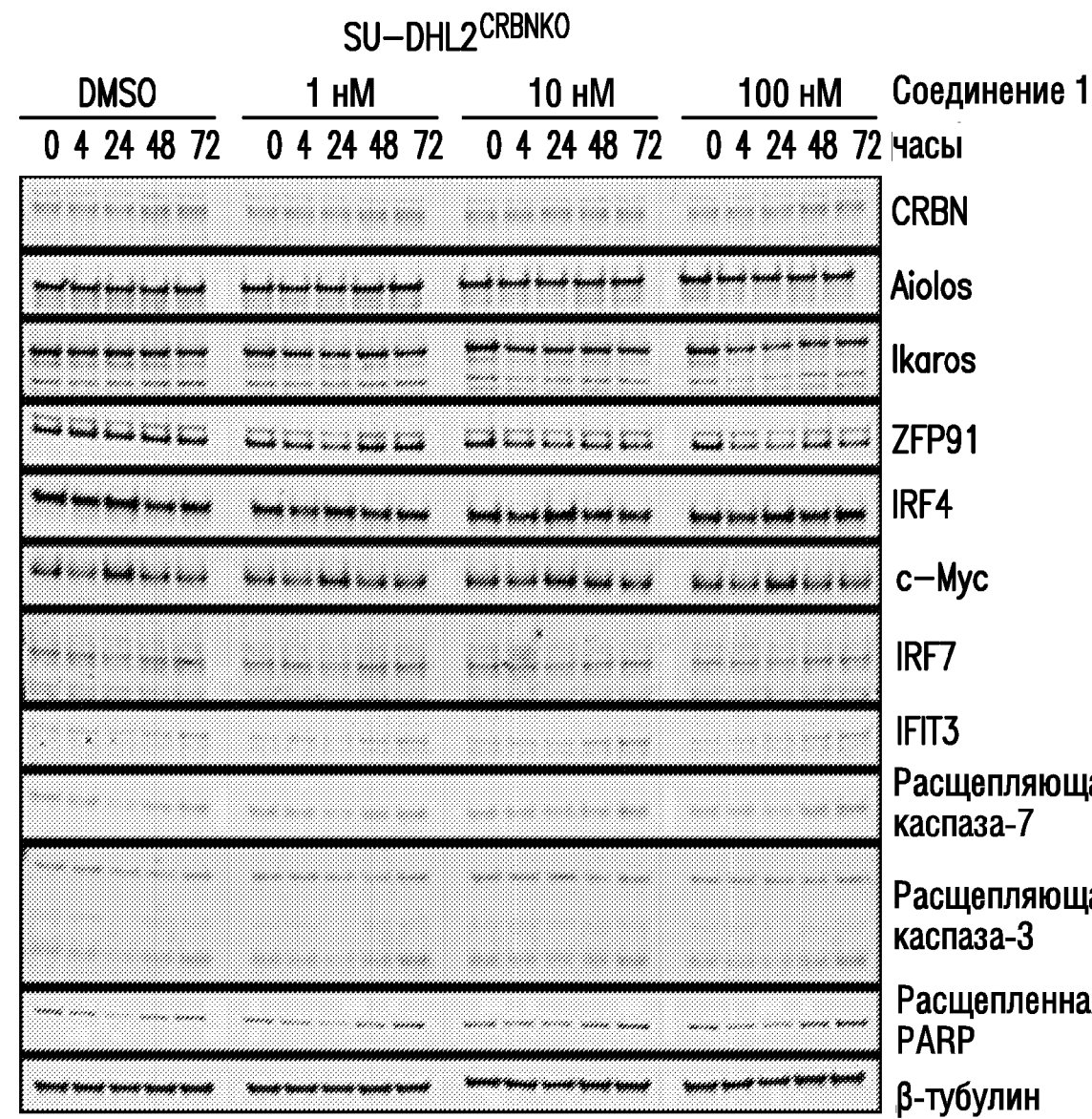
ФИГ.5А



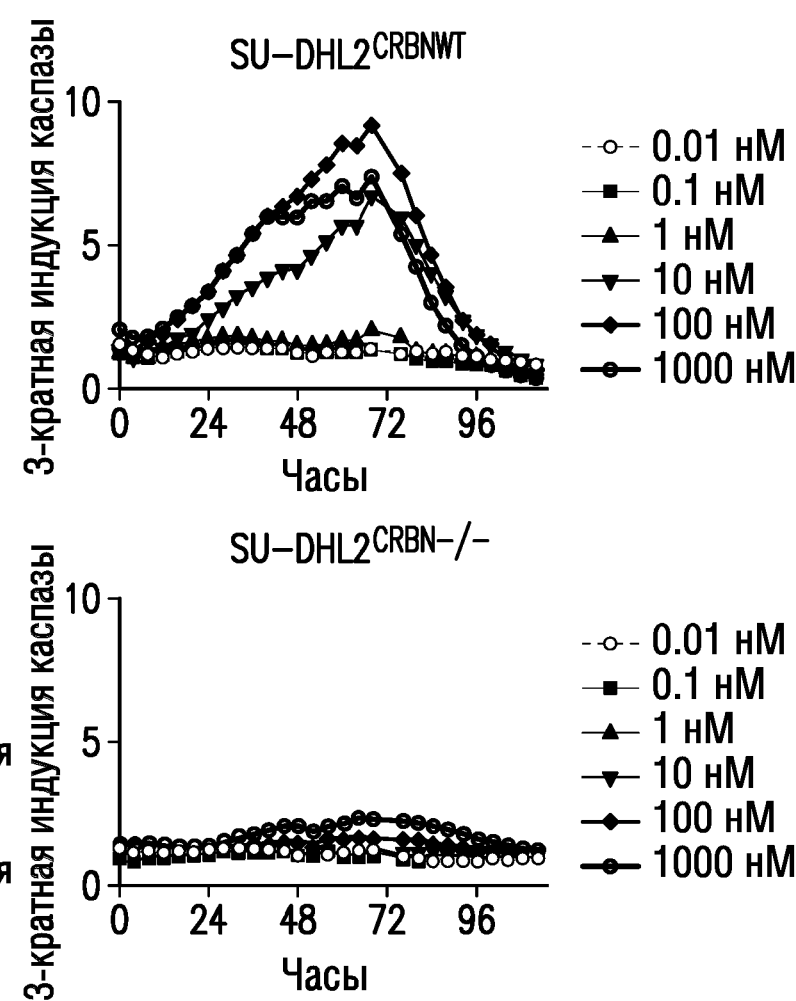
ФИГ.5В



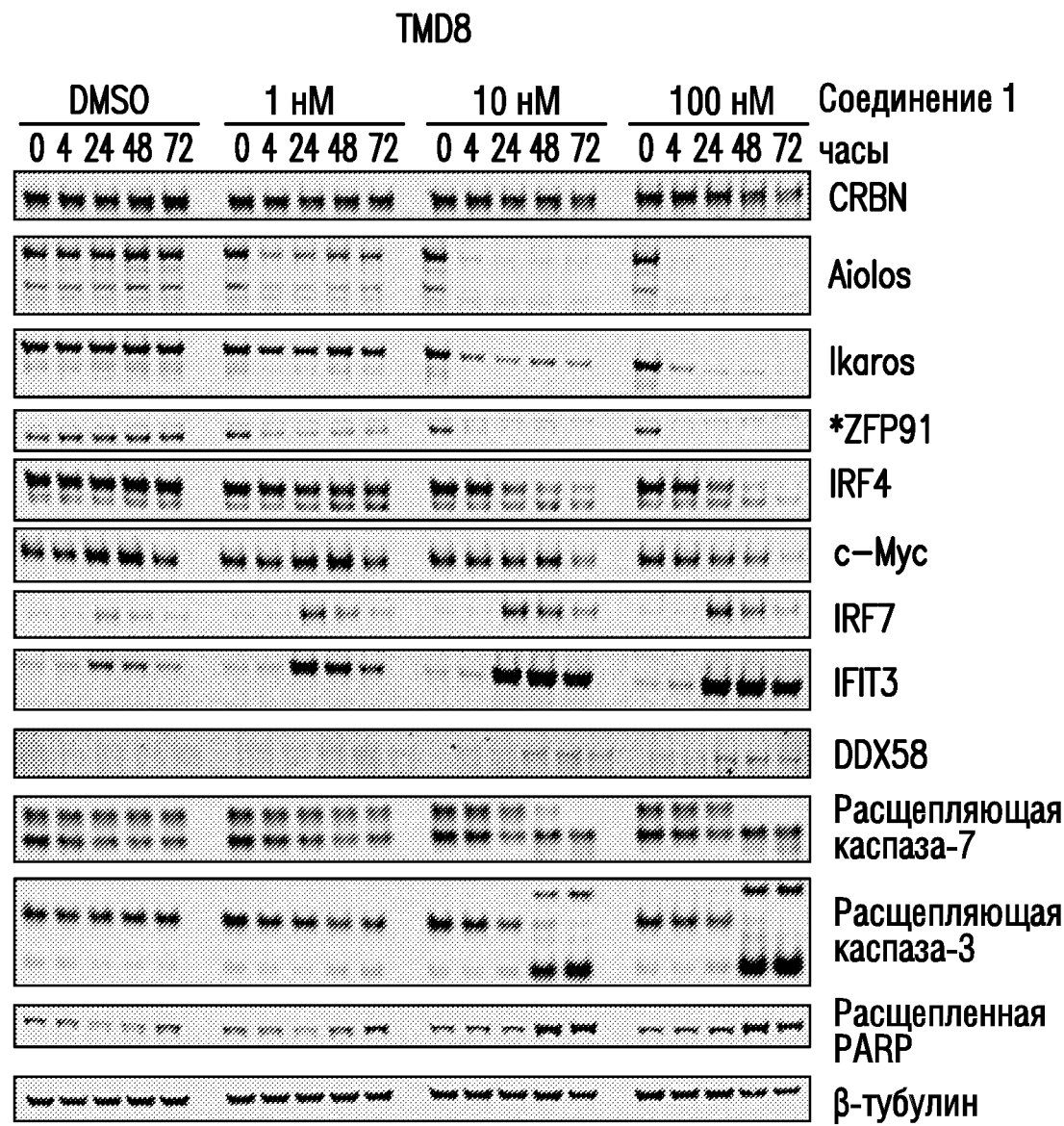
ФИГ.5С



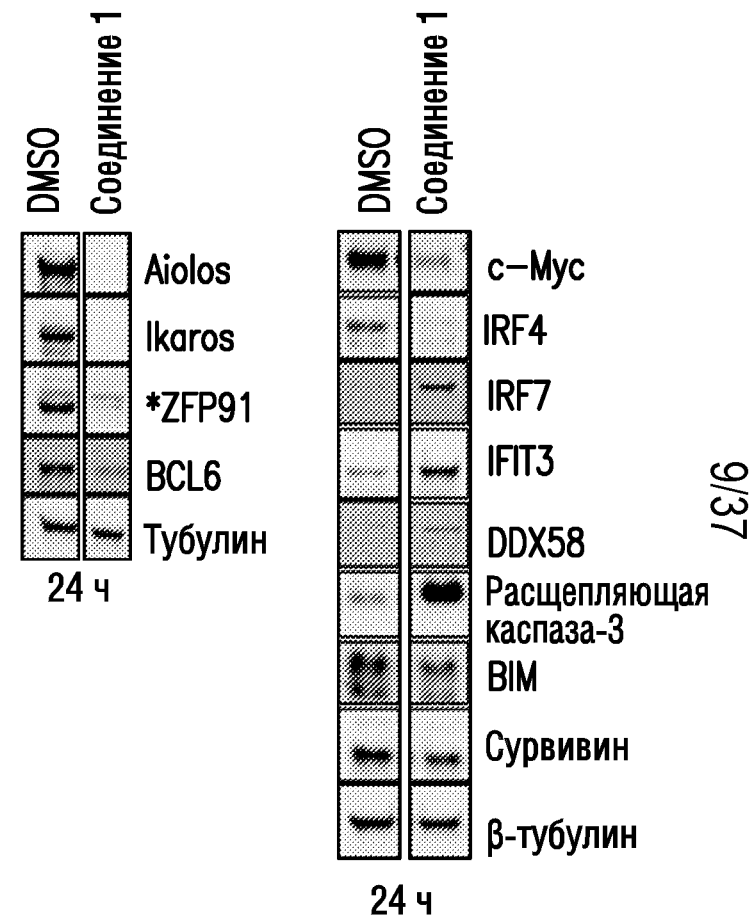
ФИГ.5D



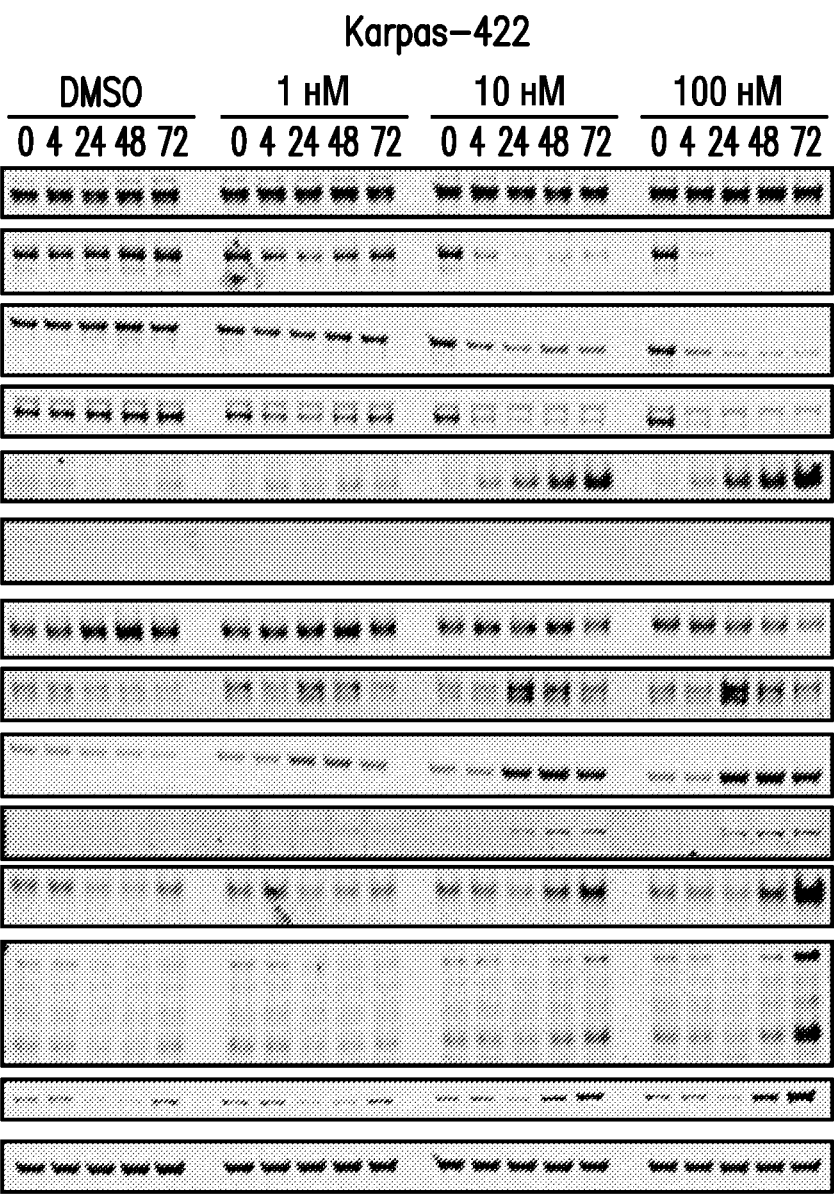
ФИГ.6А



ФИГ.6В



ФИГ.6С



Соединение 1

часы

CRBN

Ikaros

Aiolos

*ZFP91

p21

IRF-4

c-Myc

IRF-7

IFIT3

DDX58

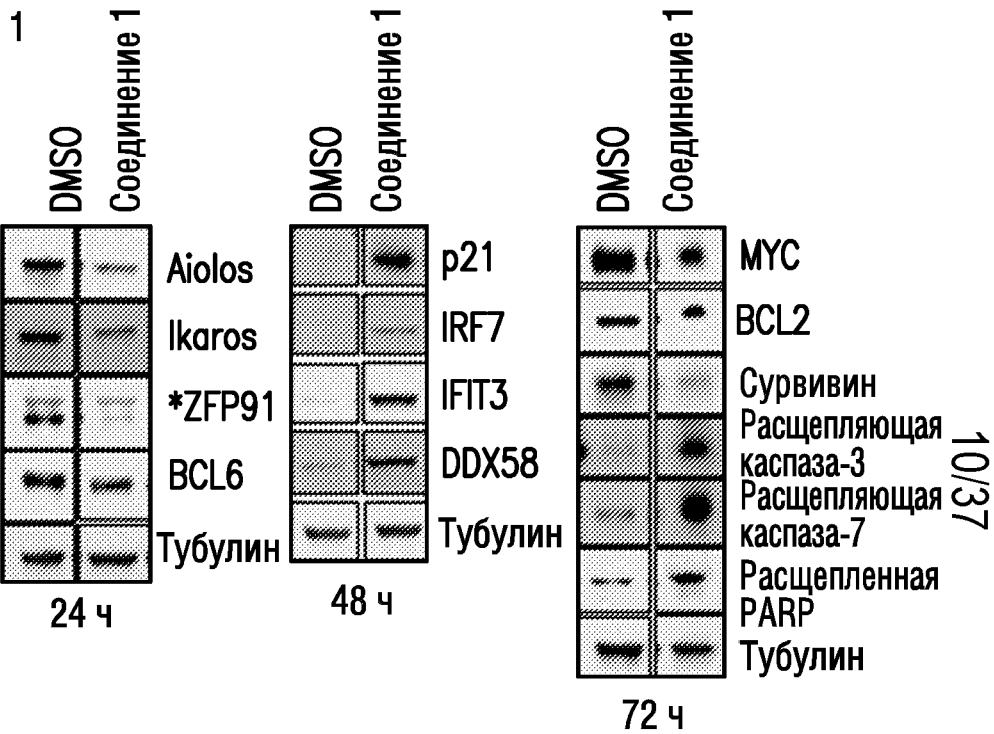
Расщепляющая
каспаза-7

Расщепляющая
каспаза-3

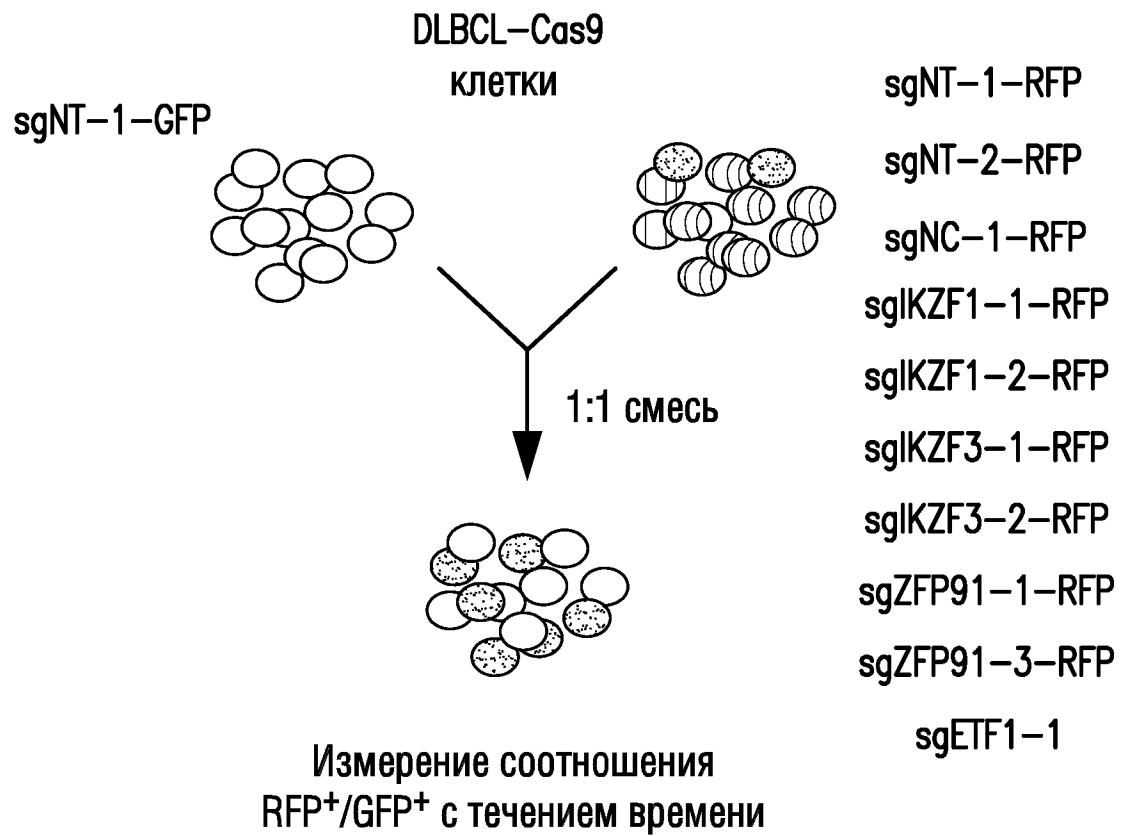
Расщепленная
PARP

β-тубулин

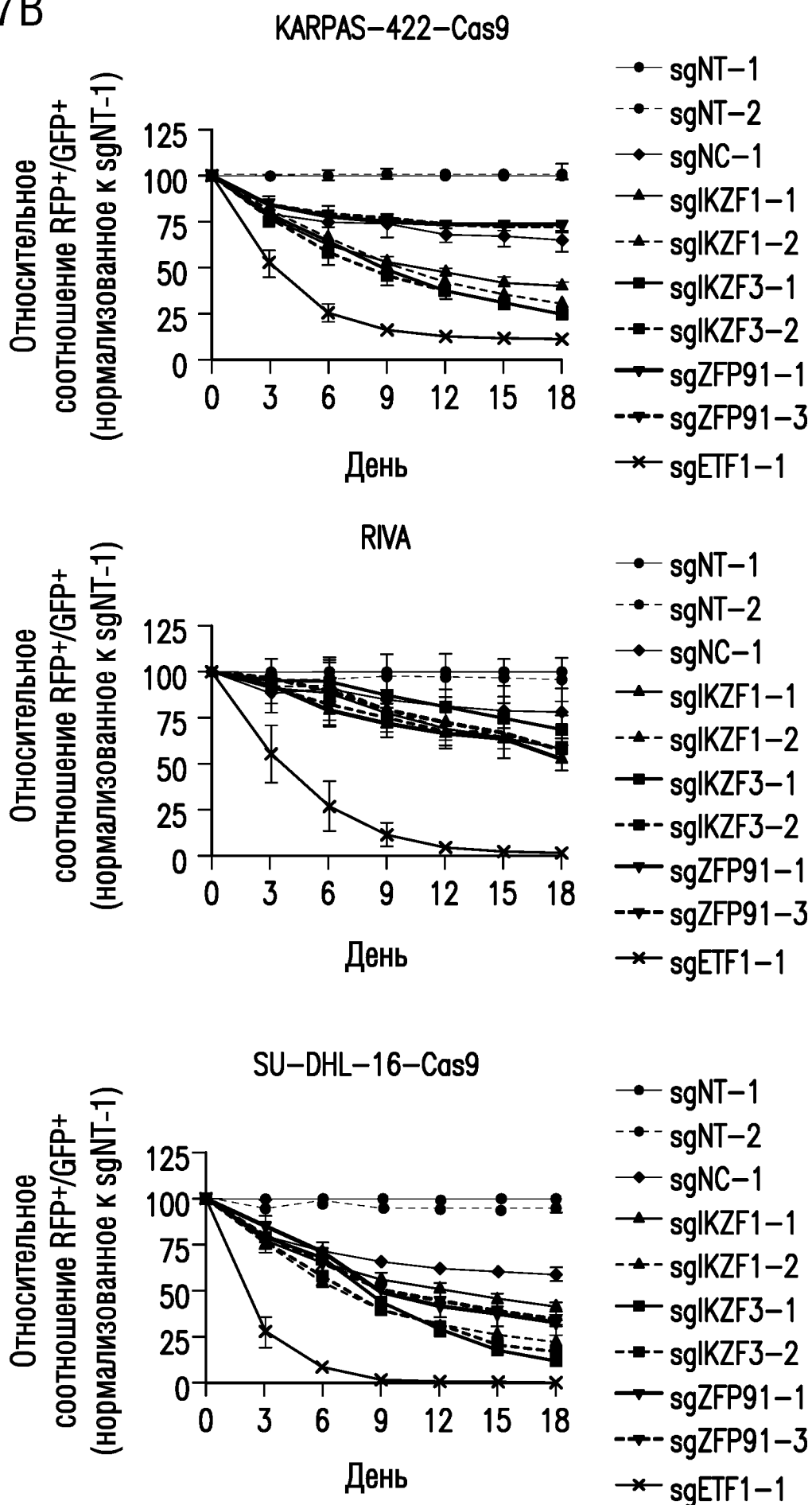
ФИГ.6D



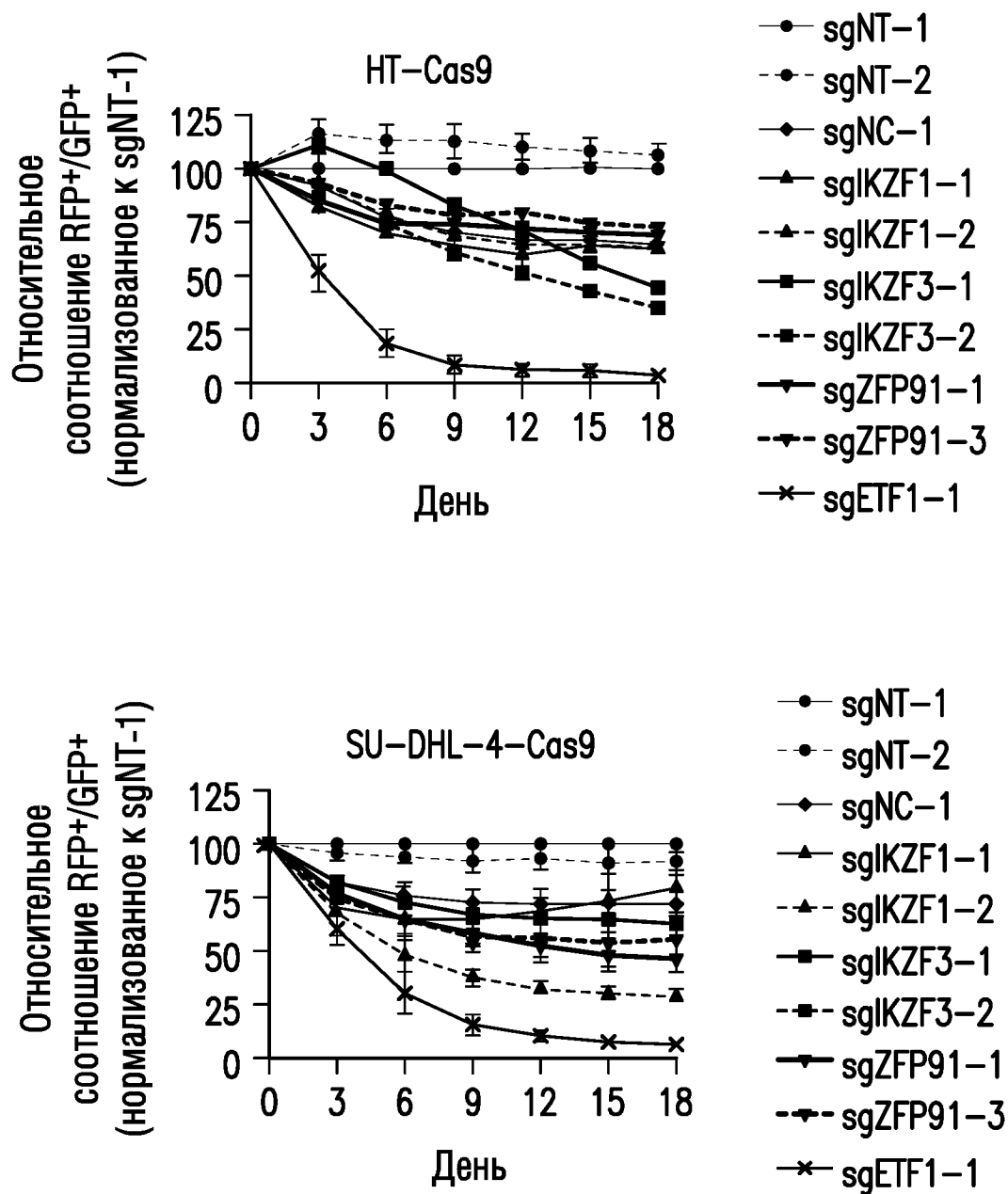
ФИГ.7А

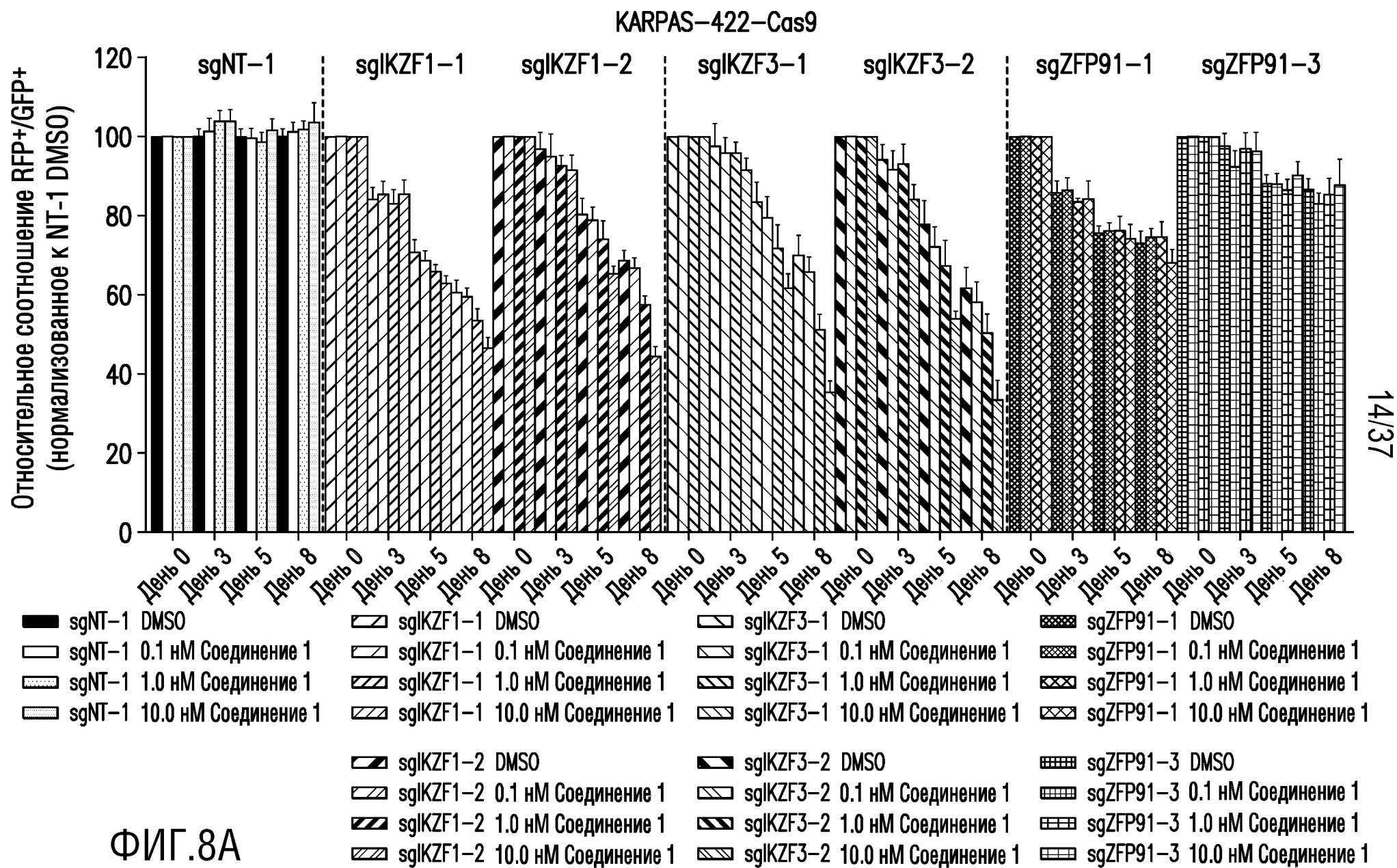


ФИГ.7В

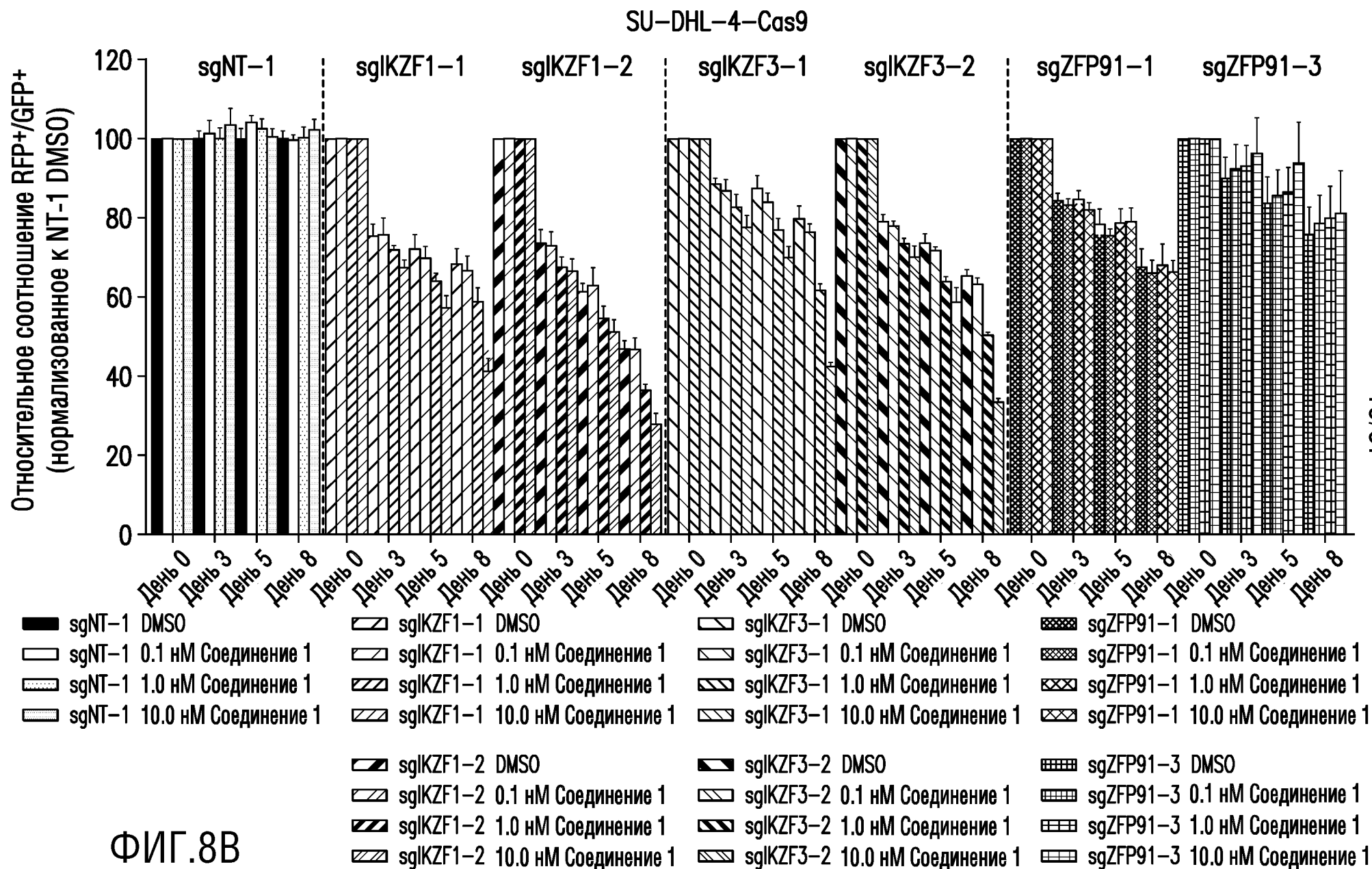


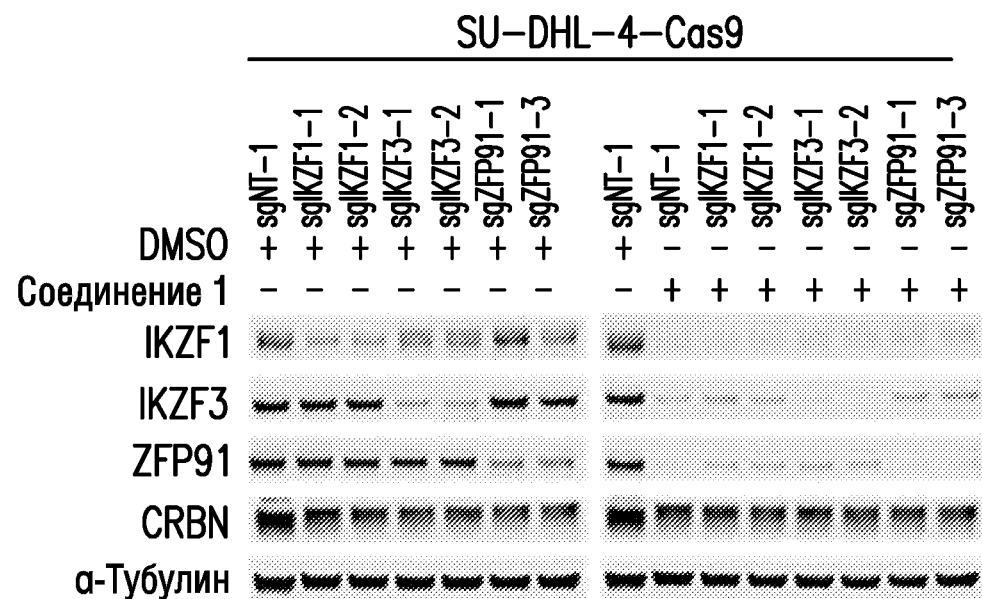
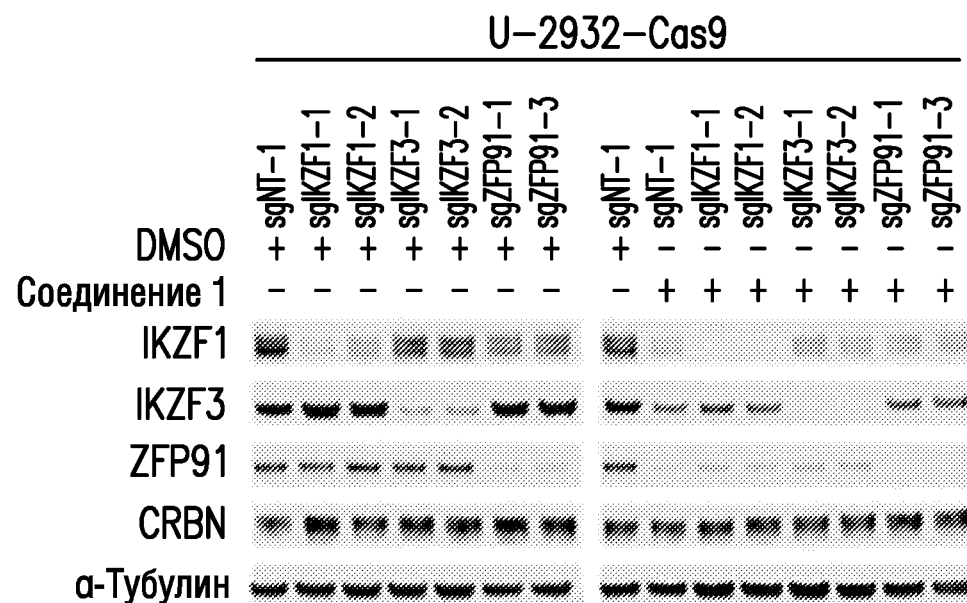
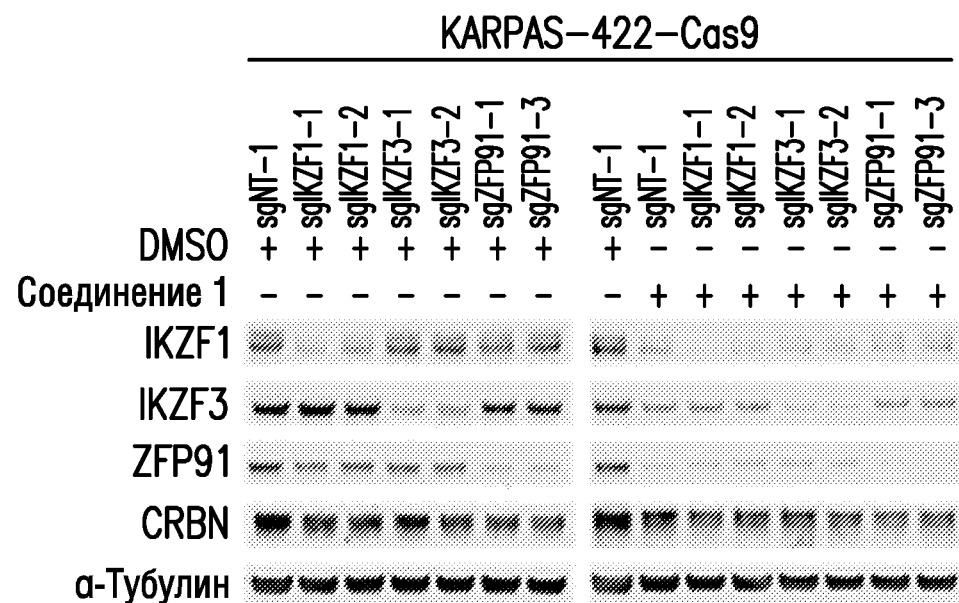
ФИГ.7В, продолжение





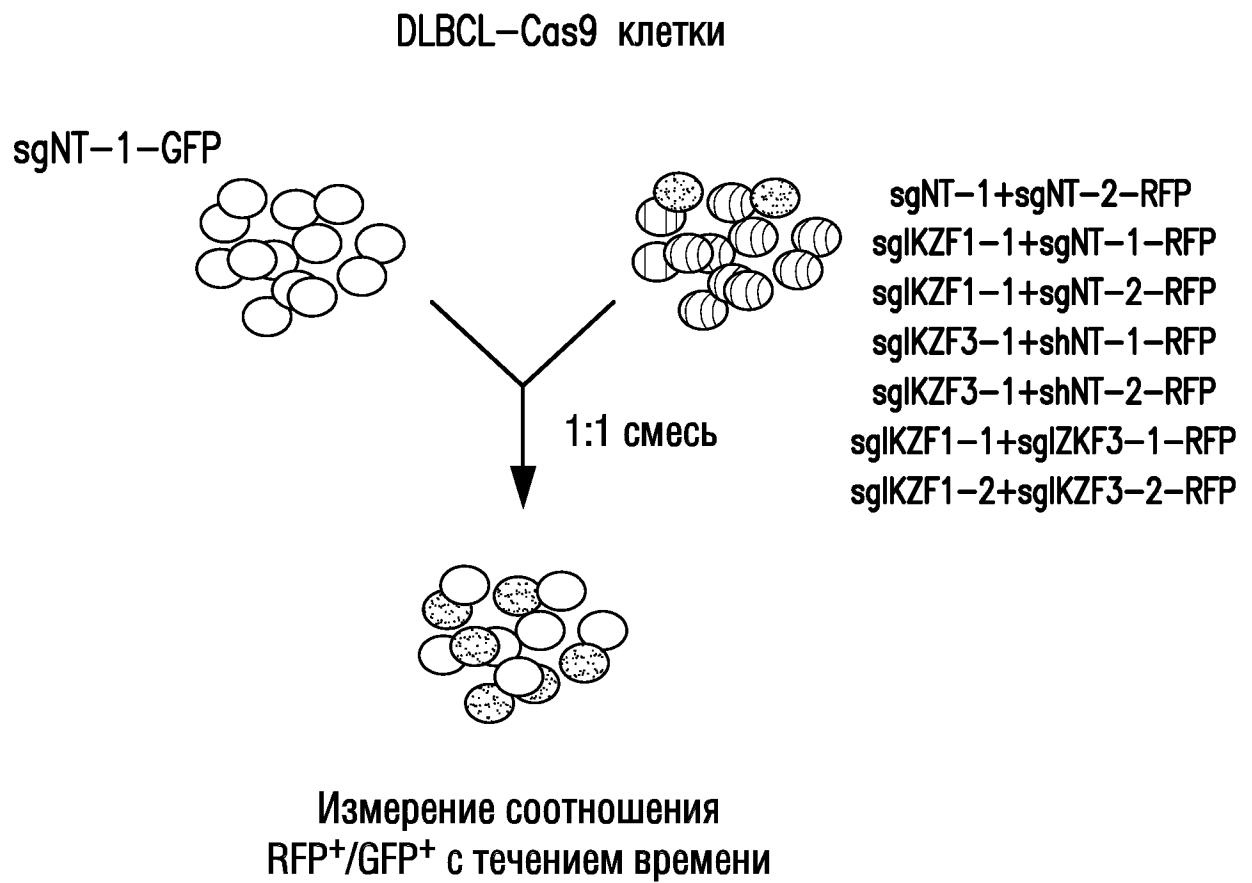
ФИГ.8А



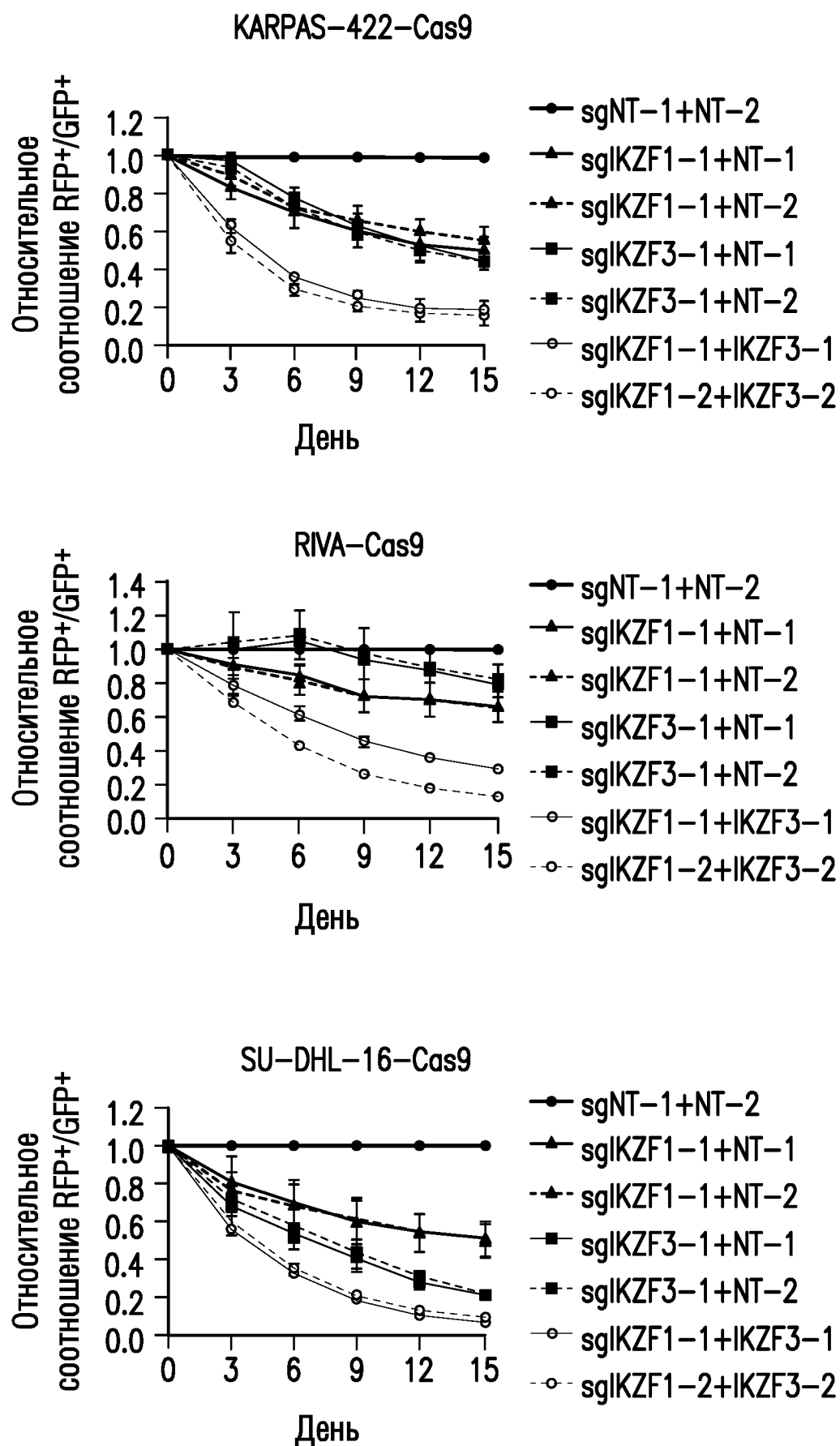


ФИГ.9

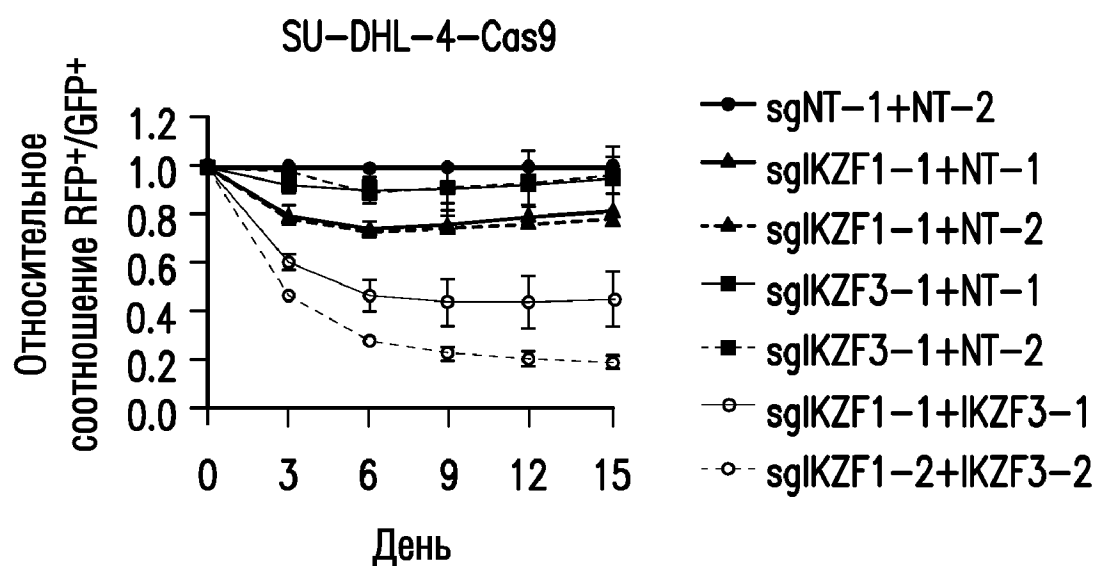
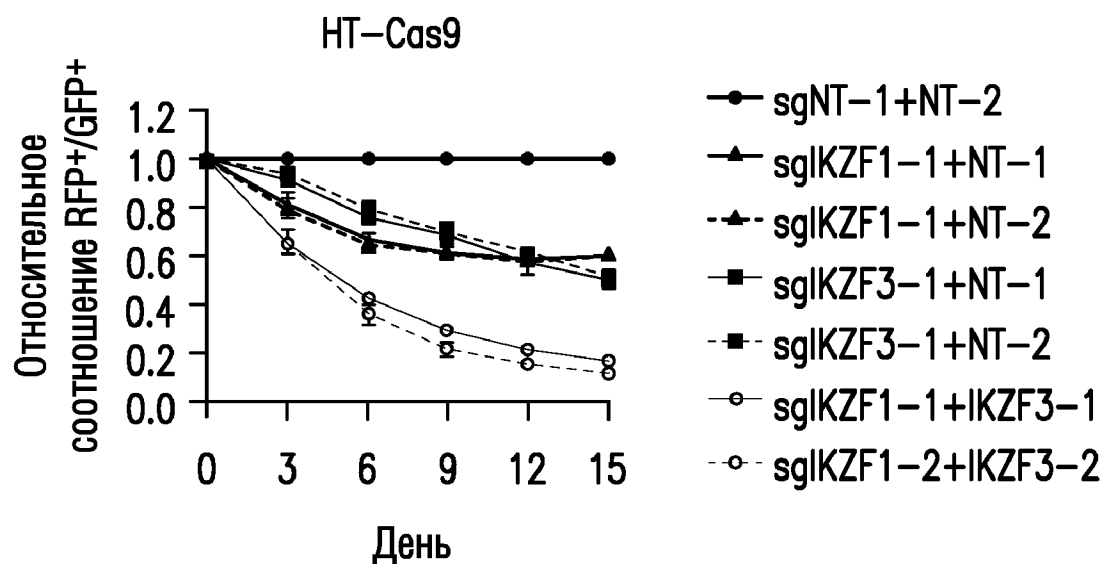
ФИГ.10А



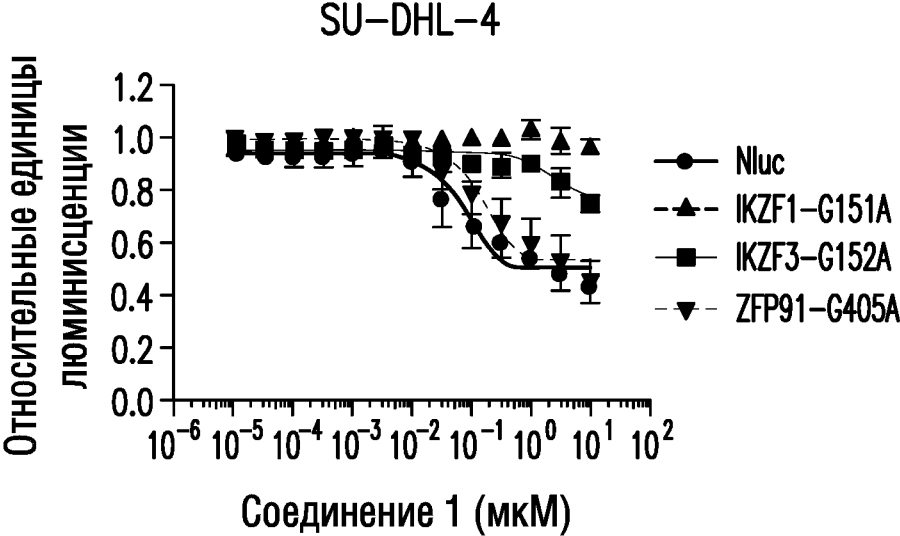
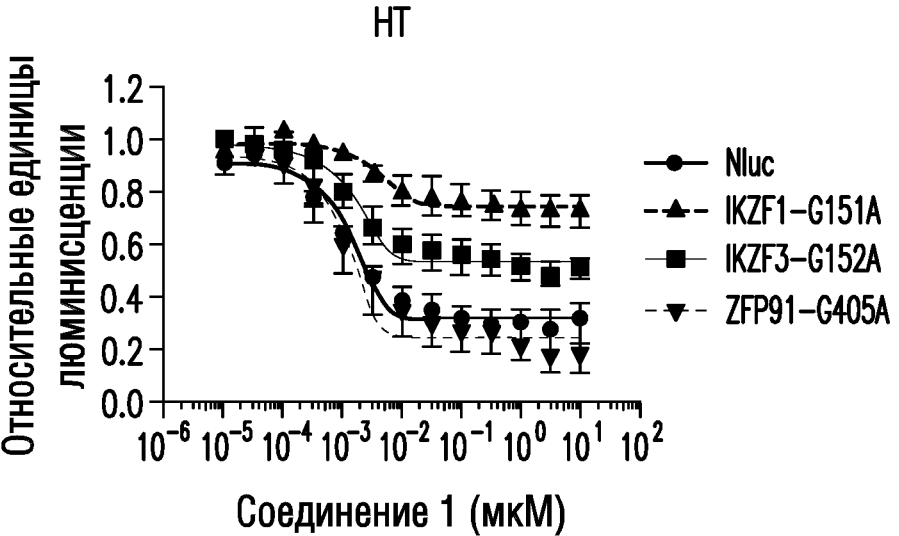
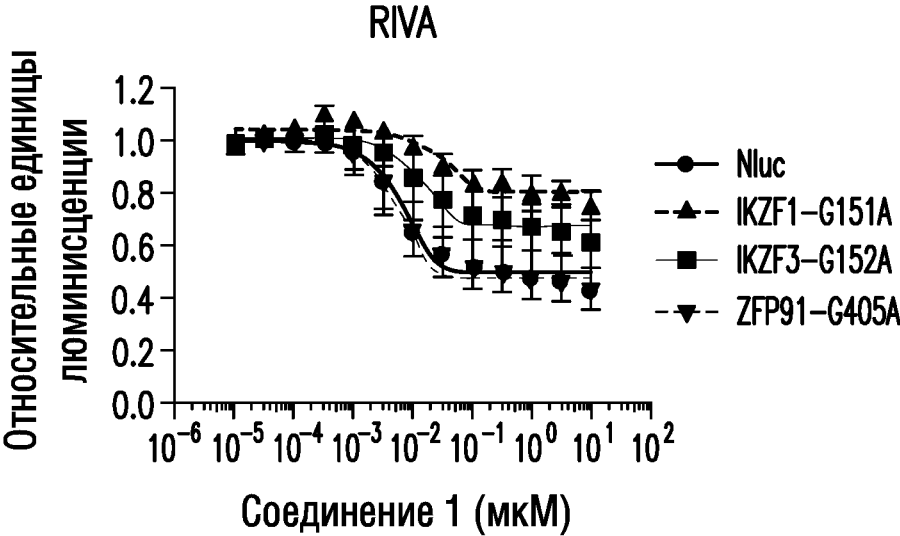
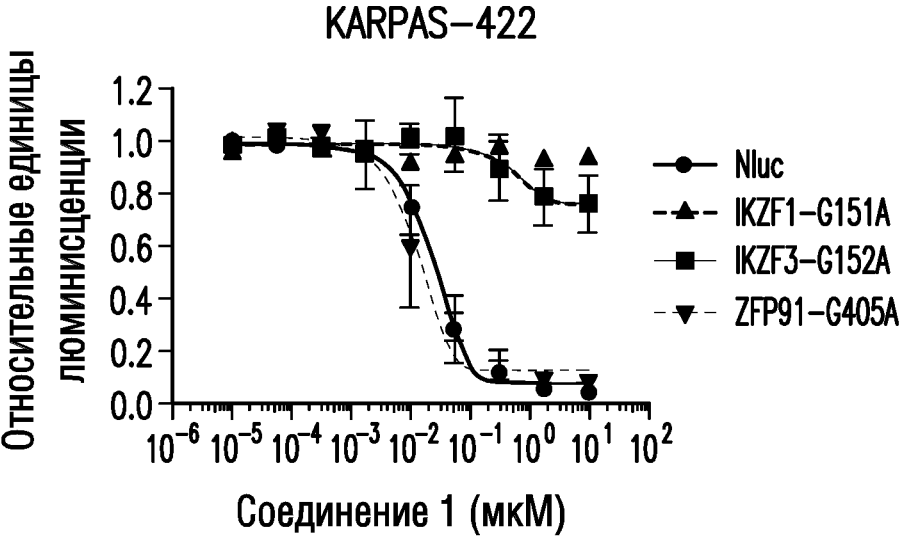
ФИГ.10В



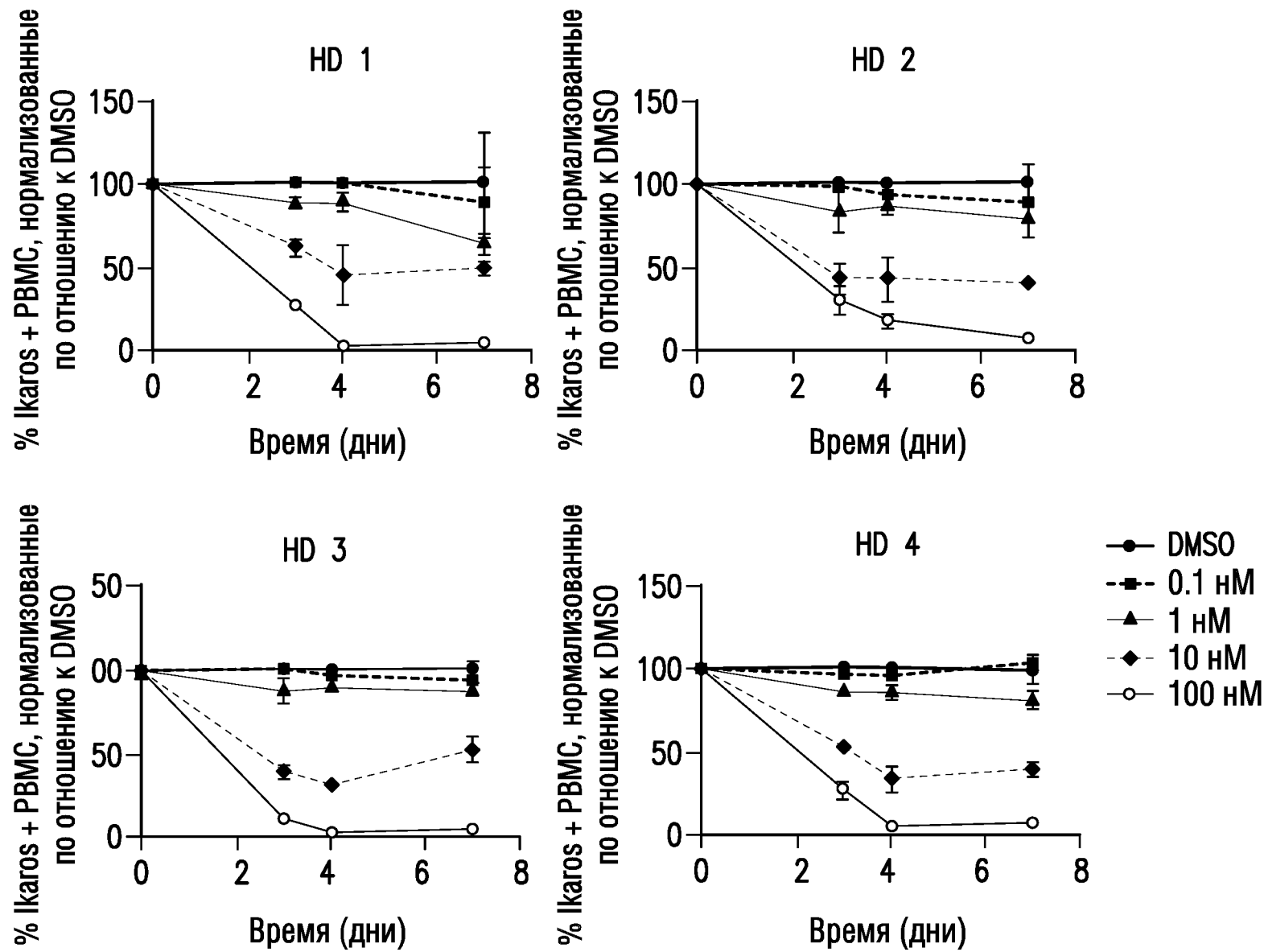
ФИГ.10В, продолжение



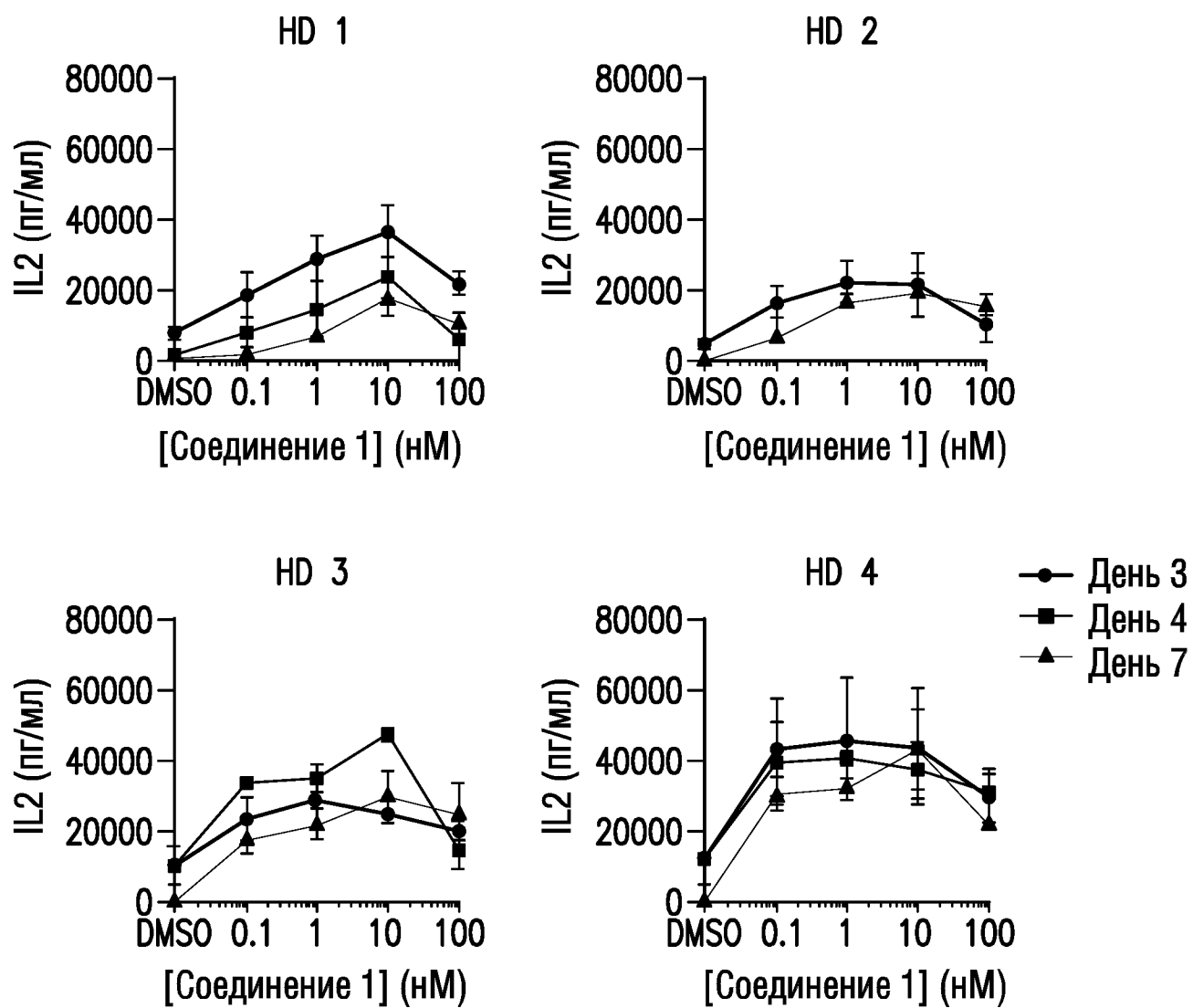
ФИГ.11



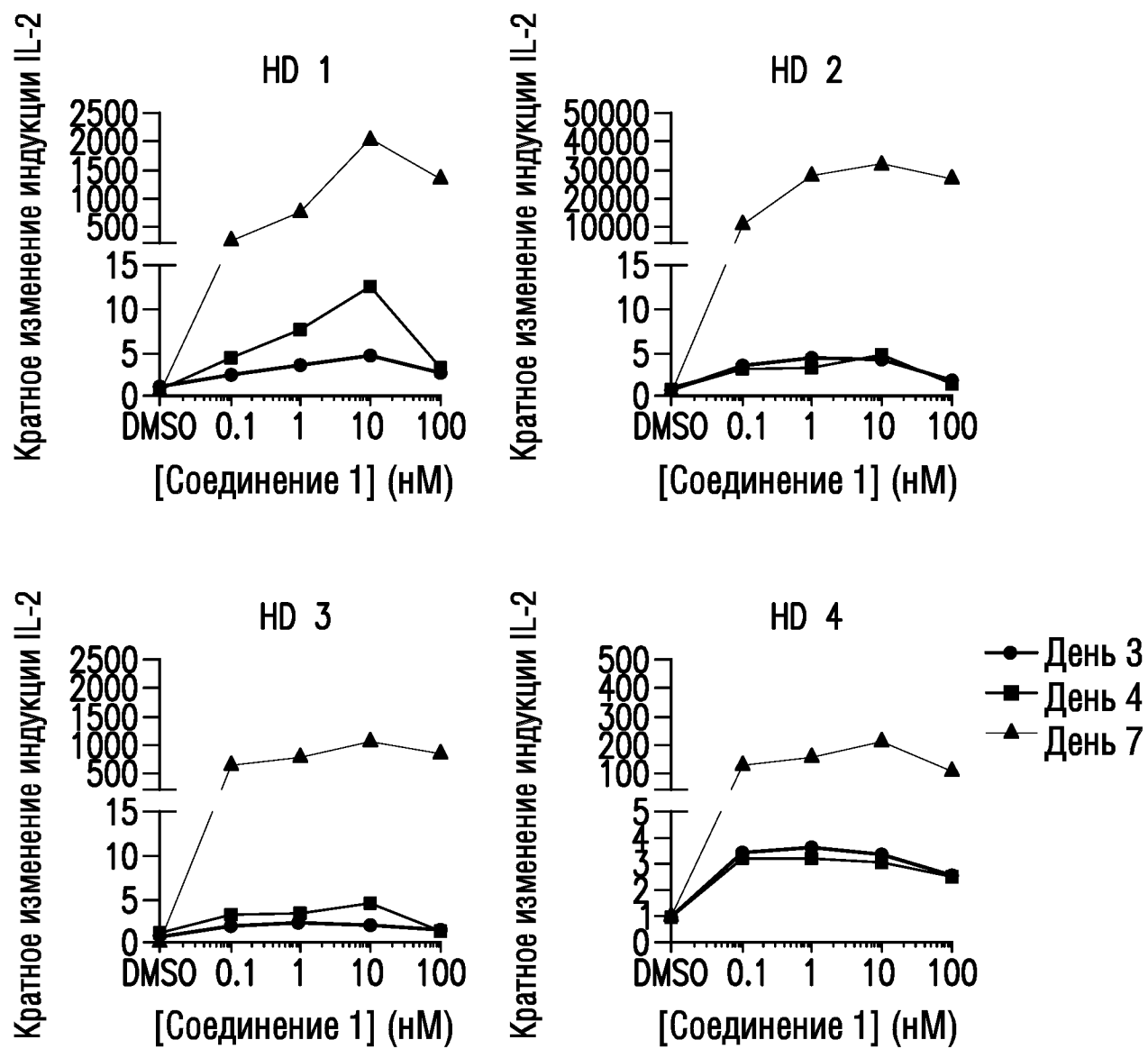
ФИГ.12



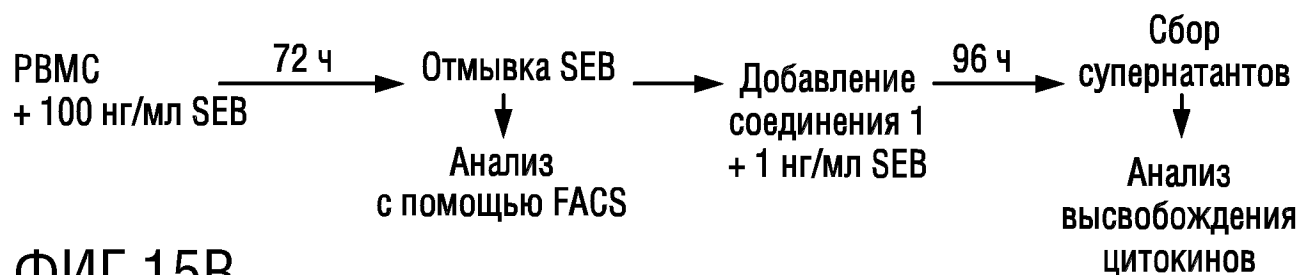
ФИГ.13



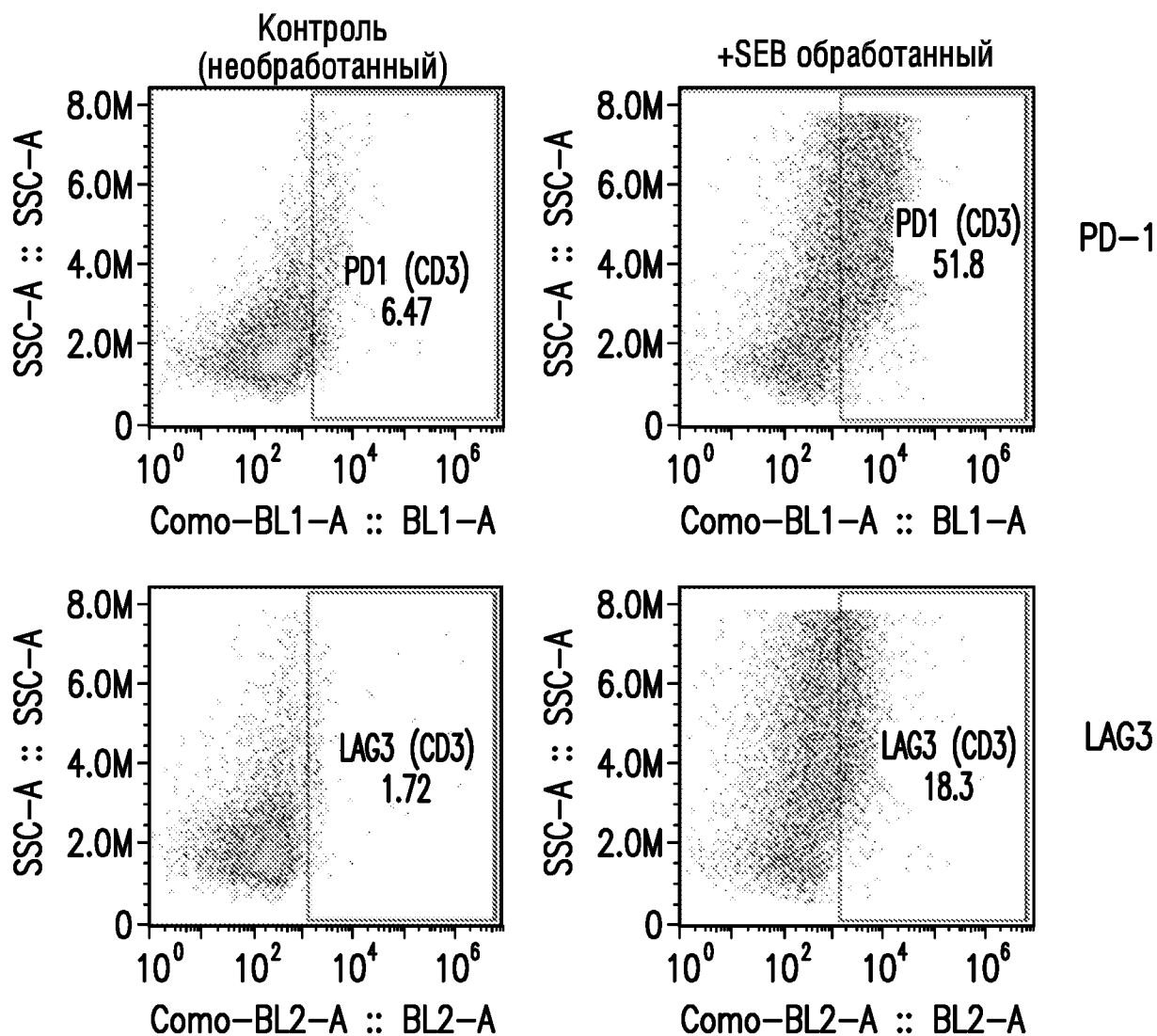
ФИГ.14



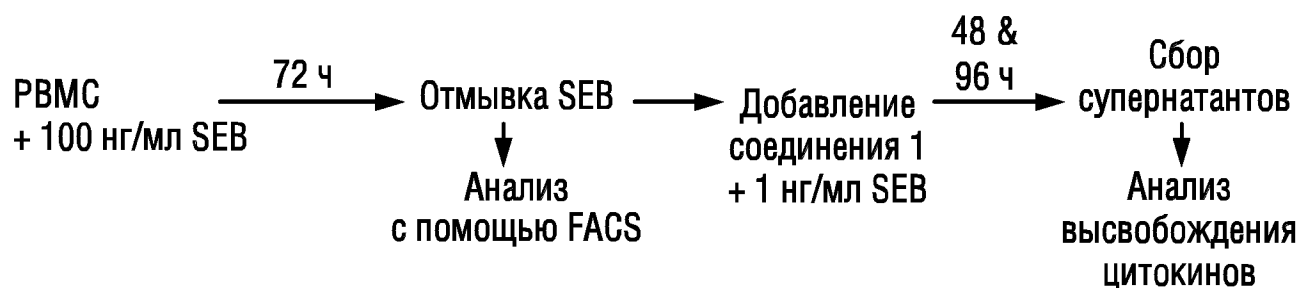
ФИГ.15А



ФИГ.15В



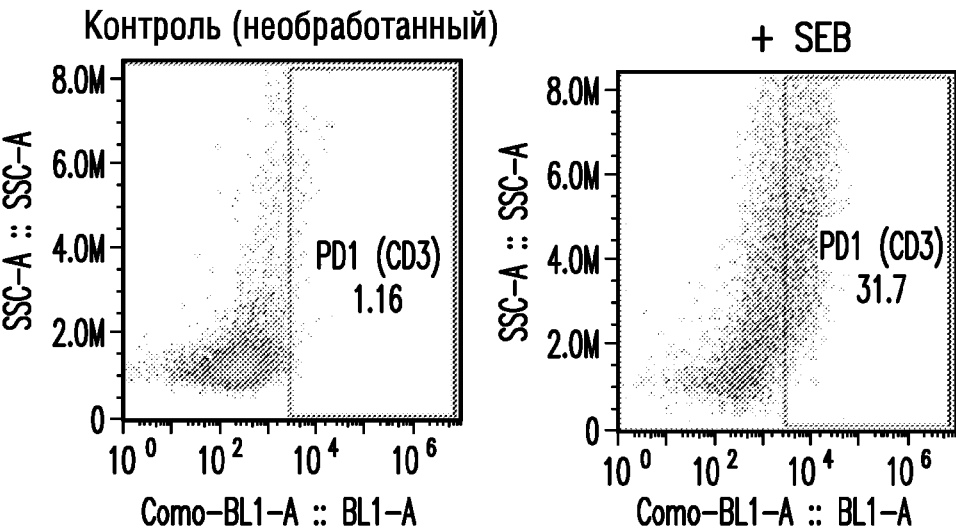
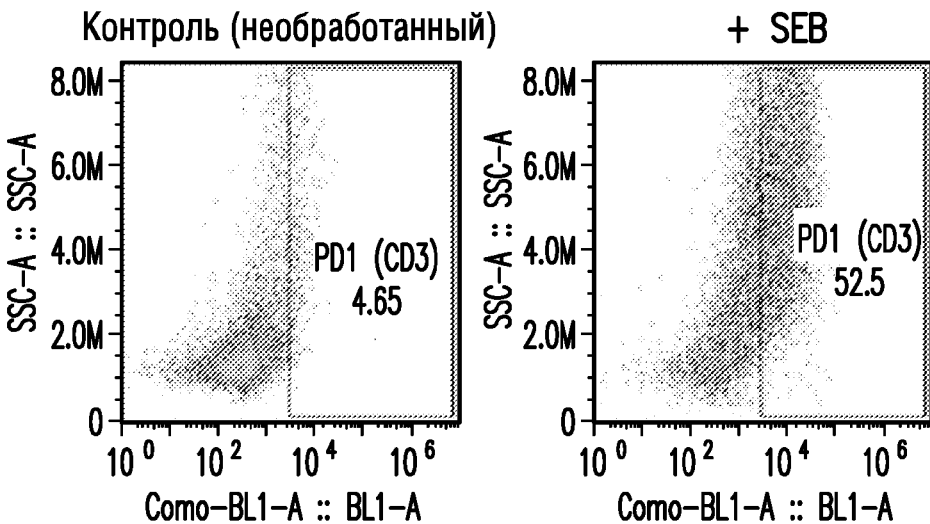
ФИГ.15С



ФИГ.15D

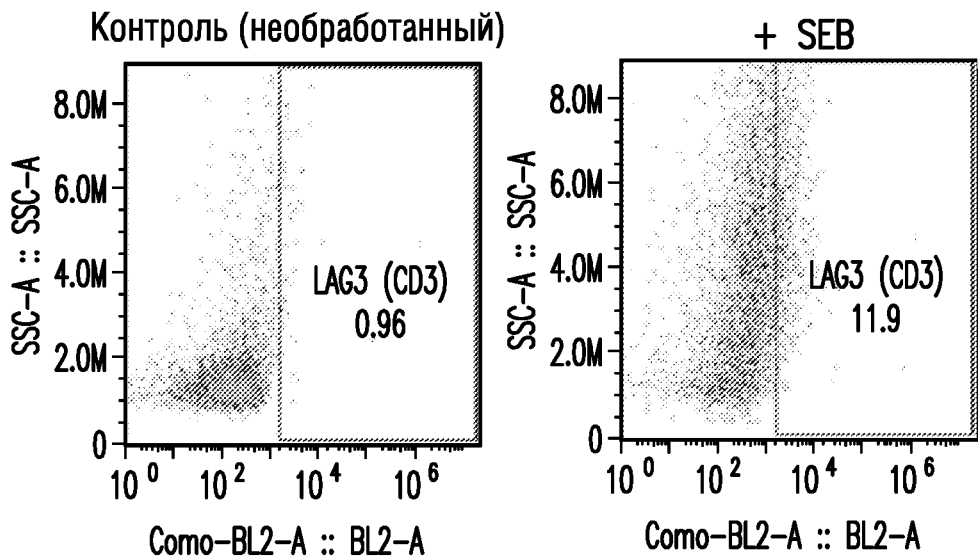
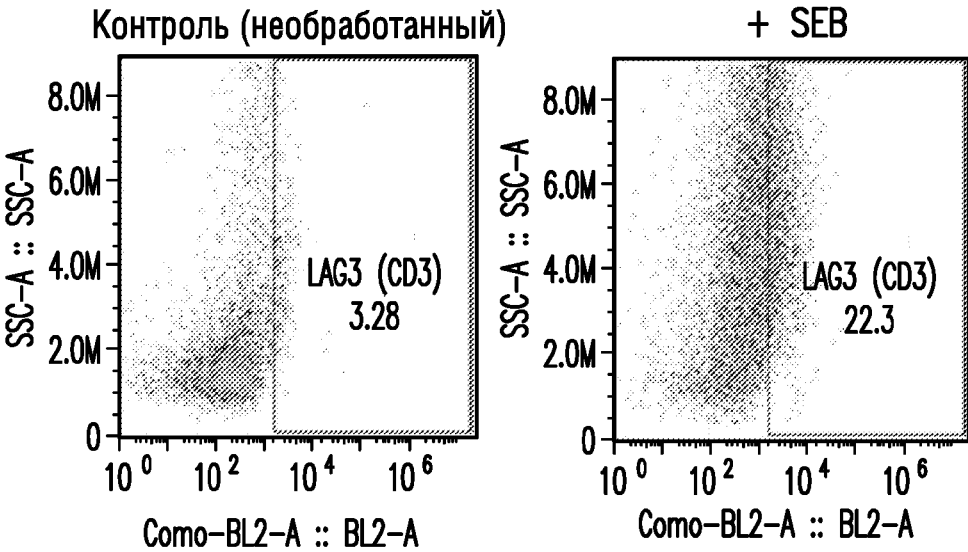
Донор 4341

Донор 5257

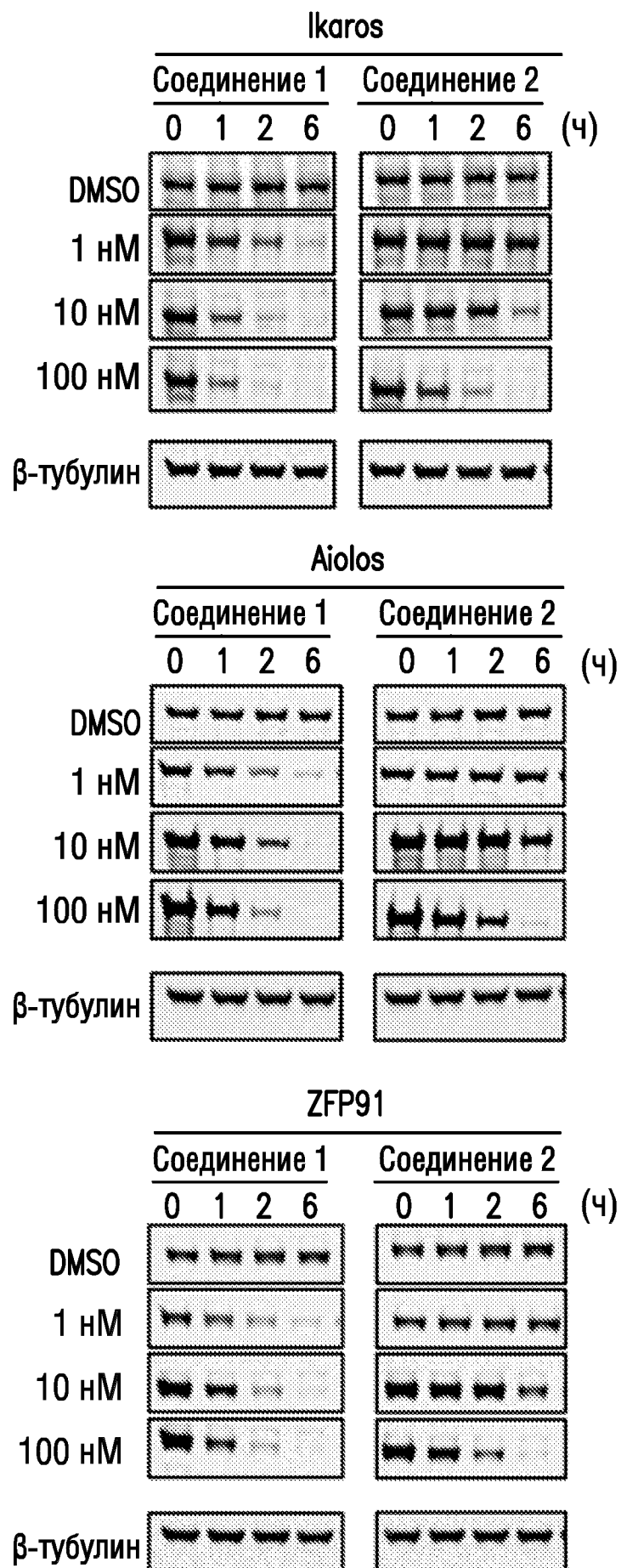


Донор 4341

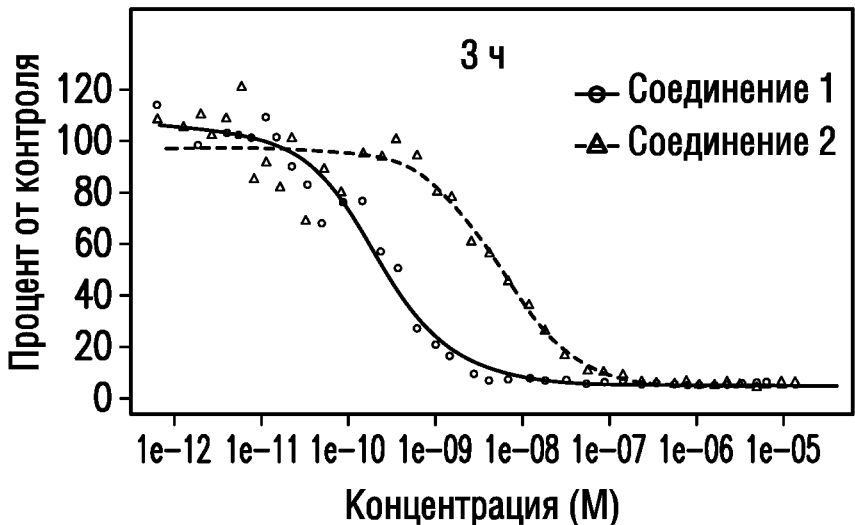
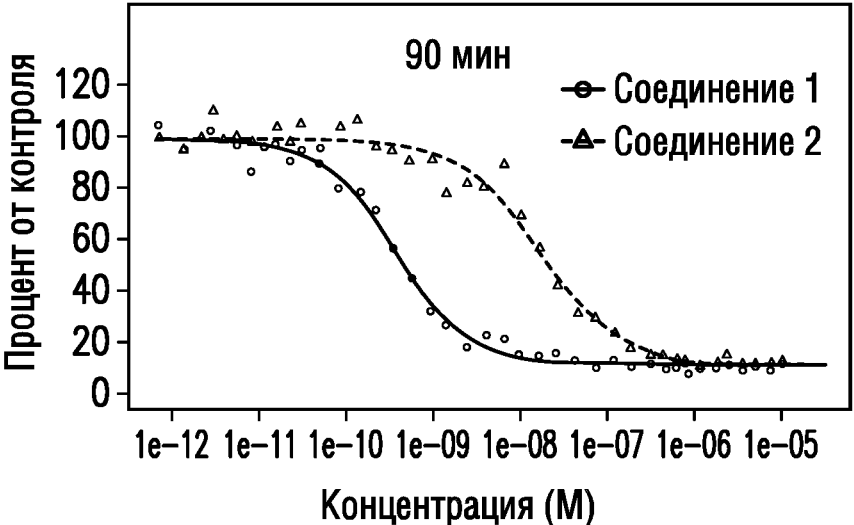
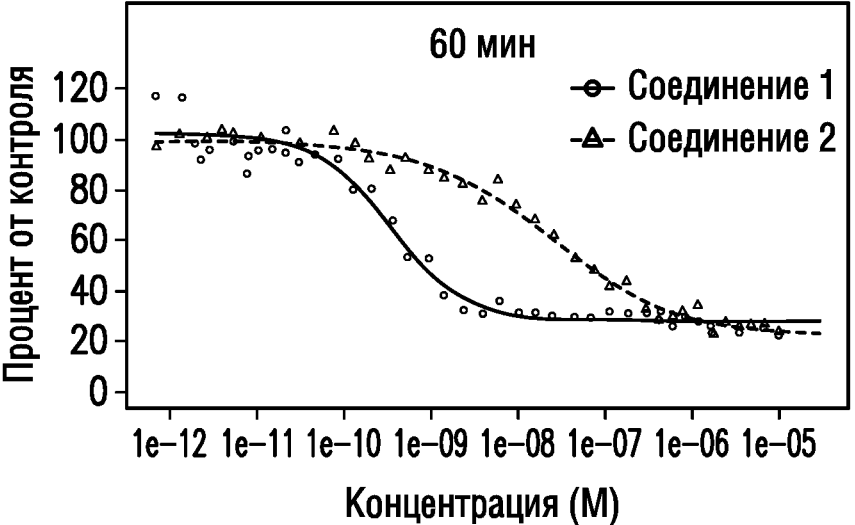
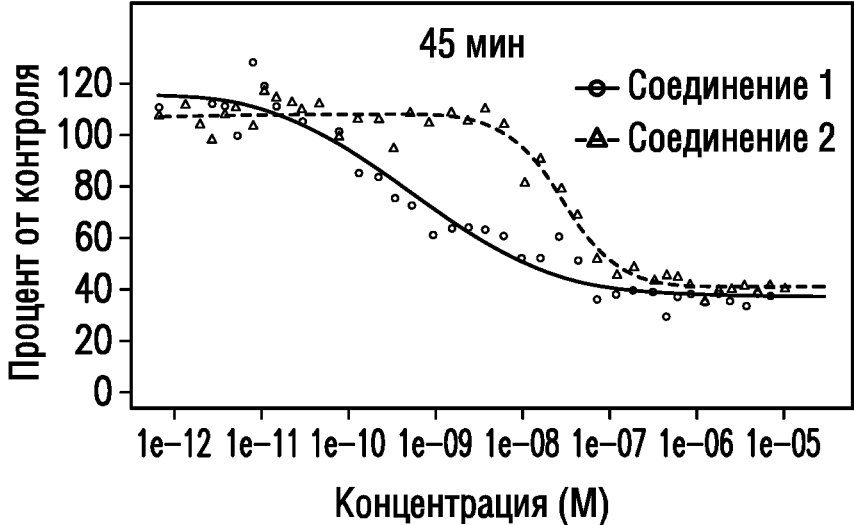
Донор 5257



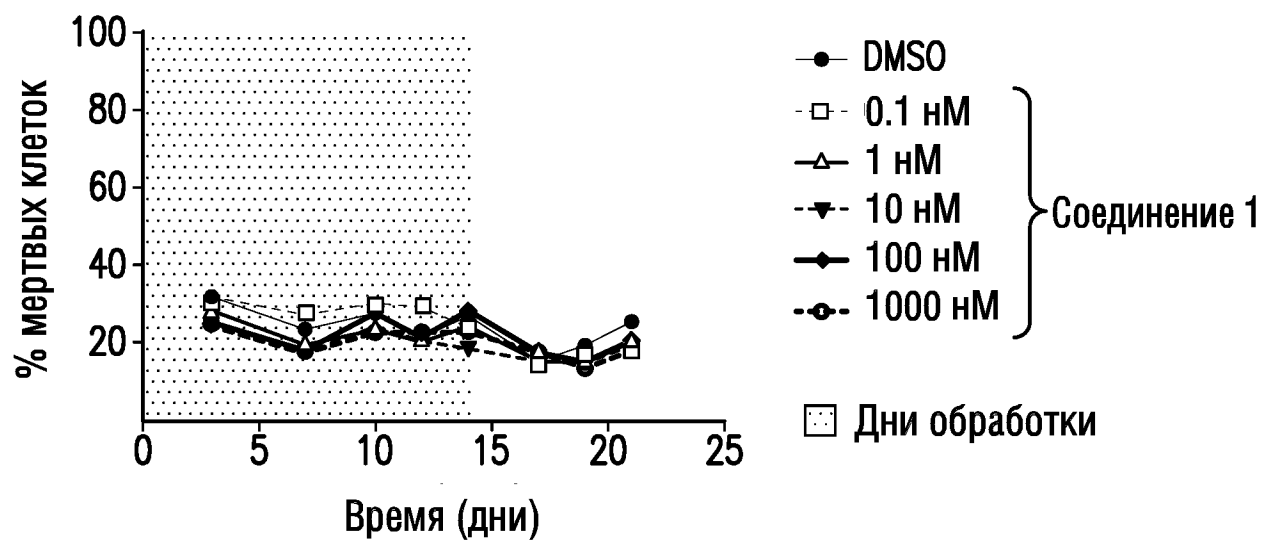
ФИГ.16



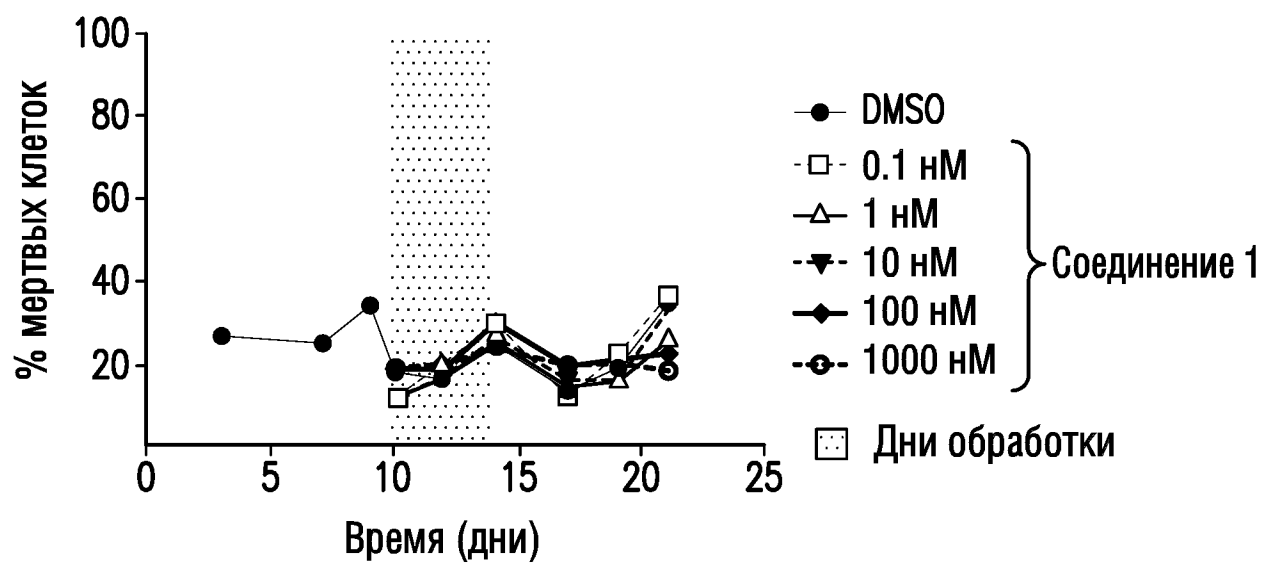
ФИГ.17



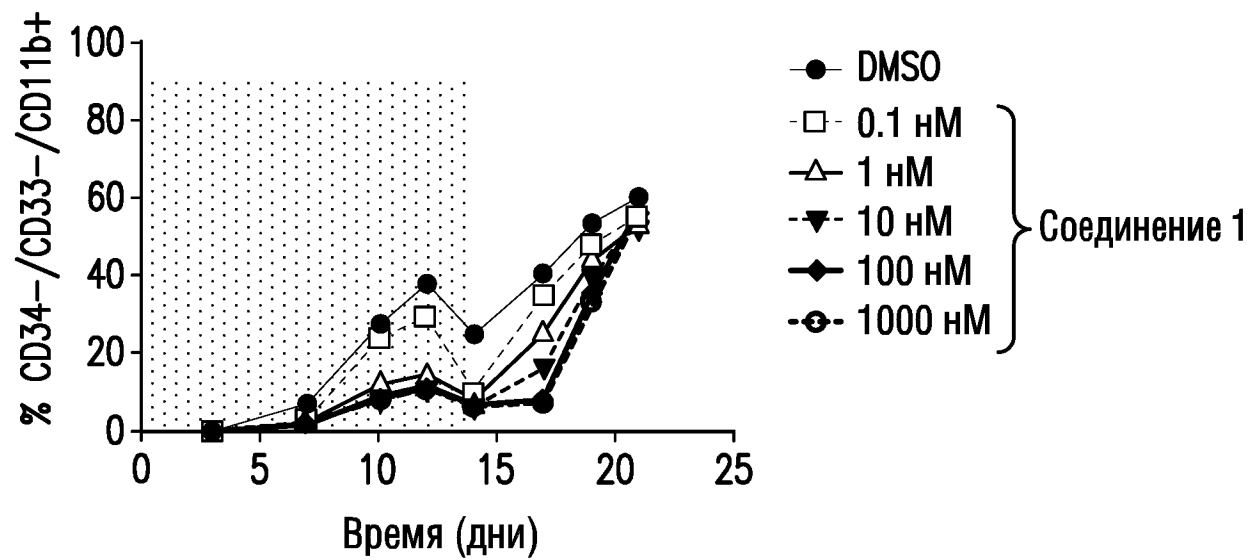
ФИГ.18А



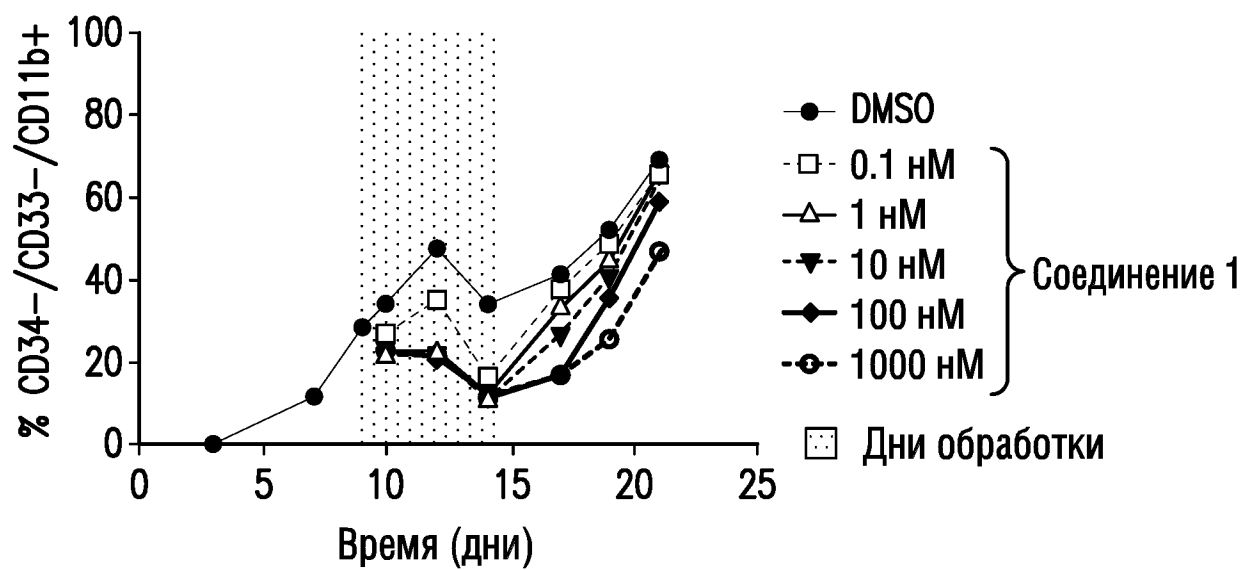
ФИГ.18В



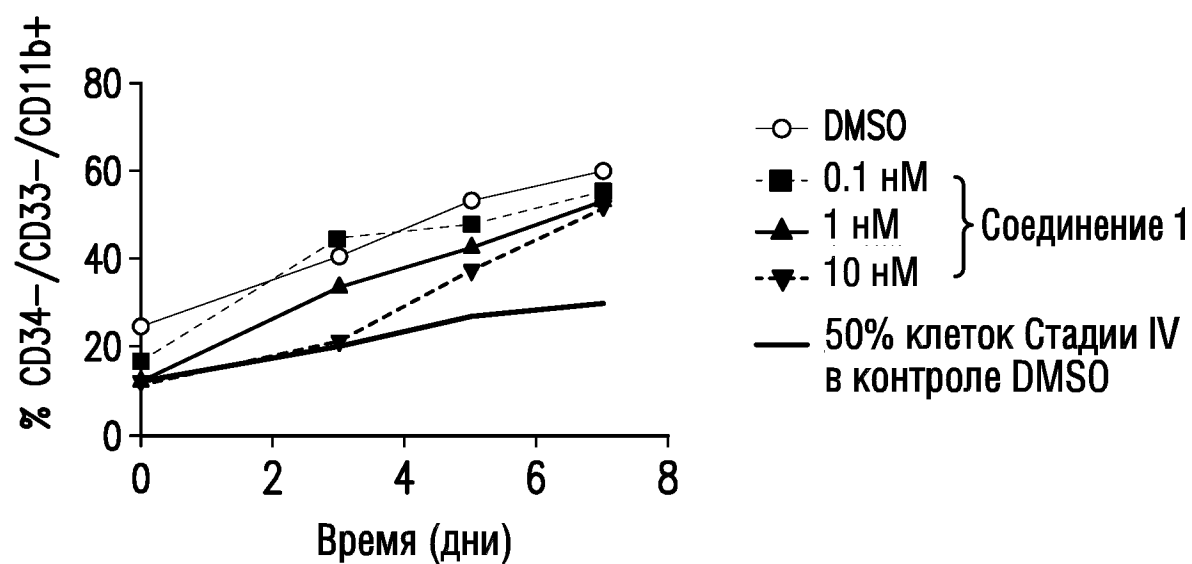
ФИГ.19А



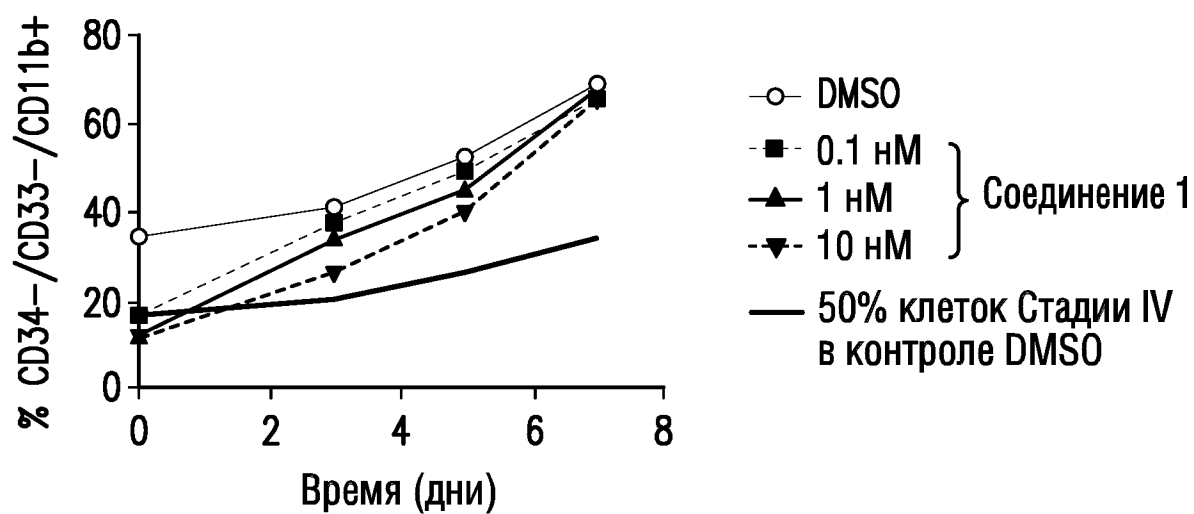
ФИГ.19В



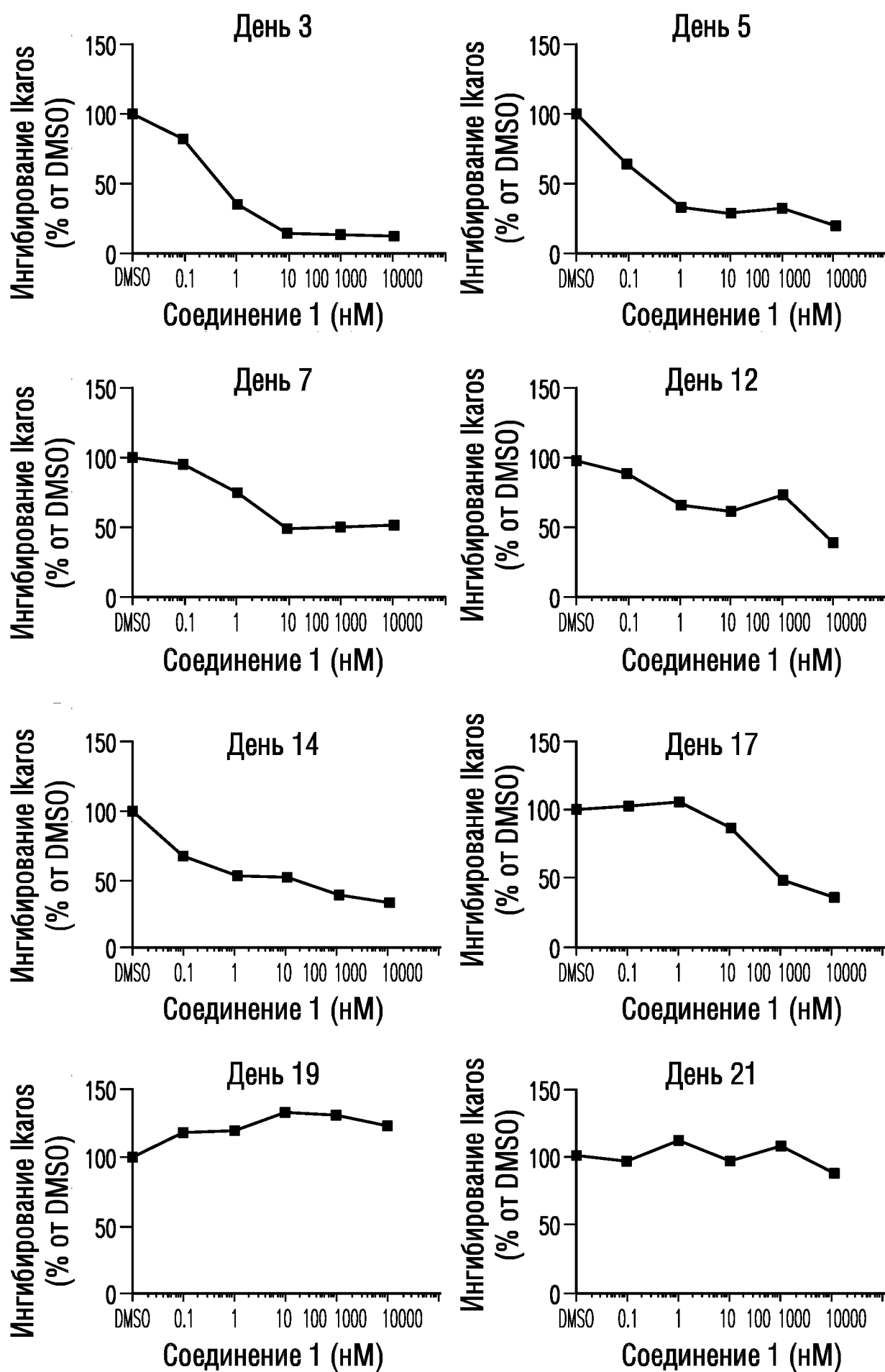
ФИГ.20А



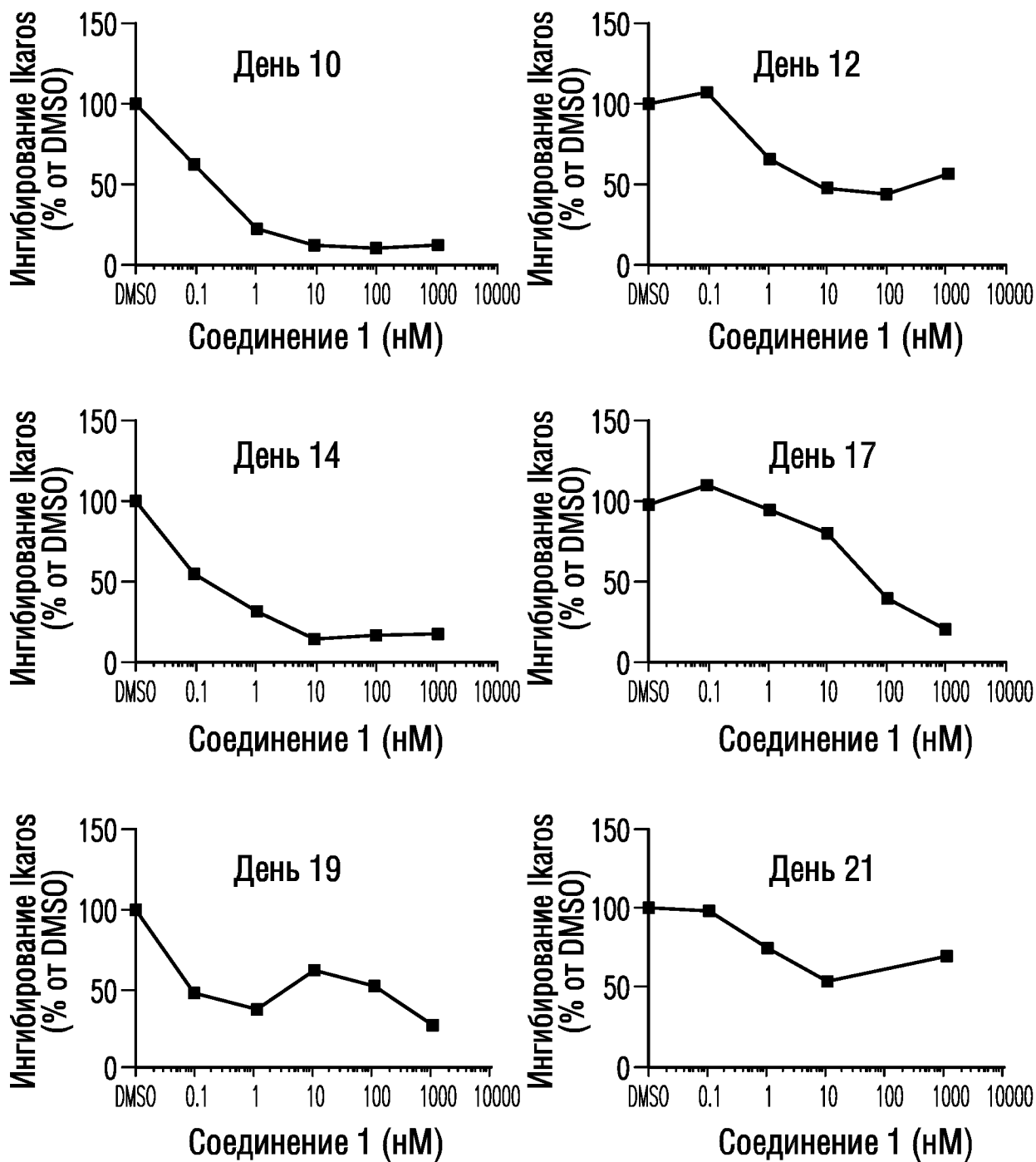
ФИГ.20В



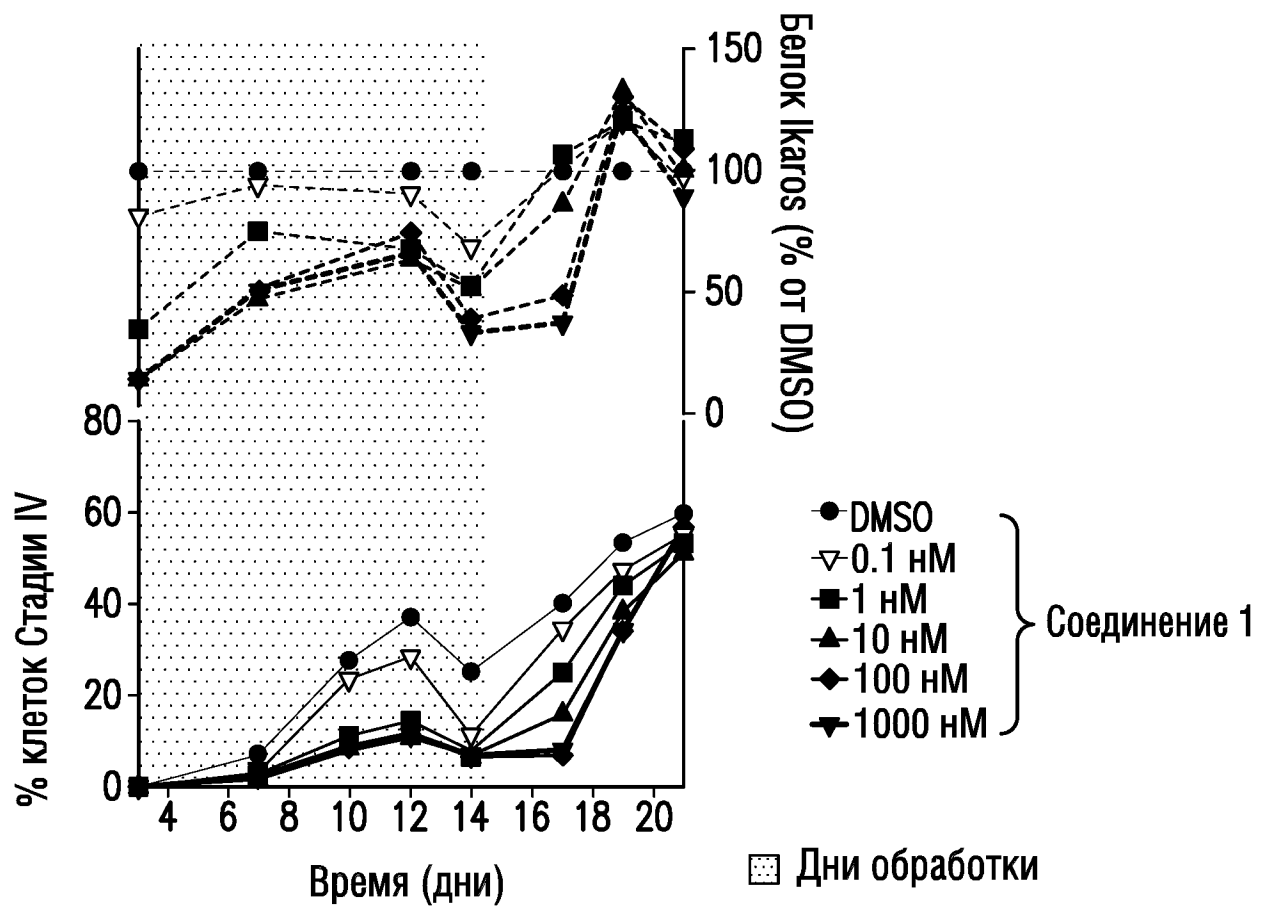
ФИГ.21



ФИГ.22

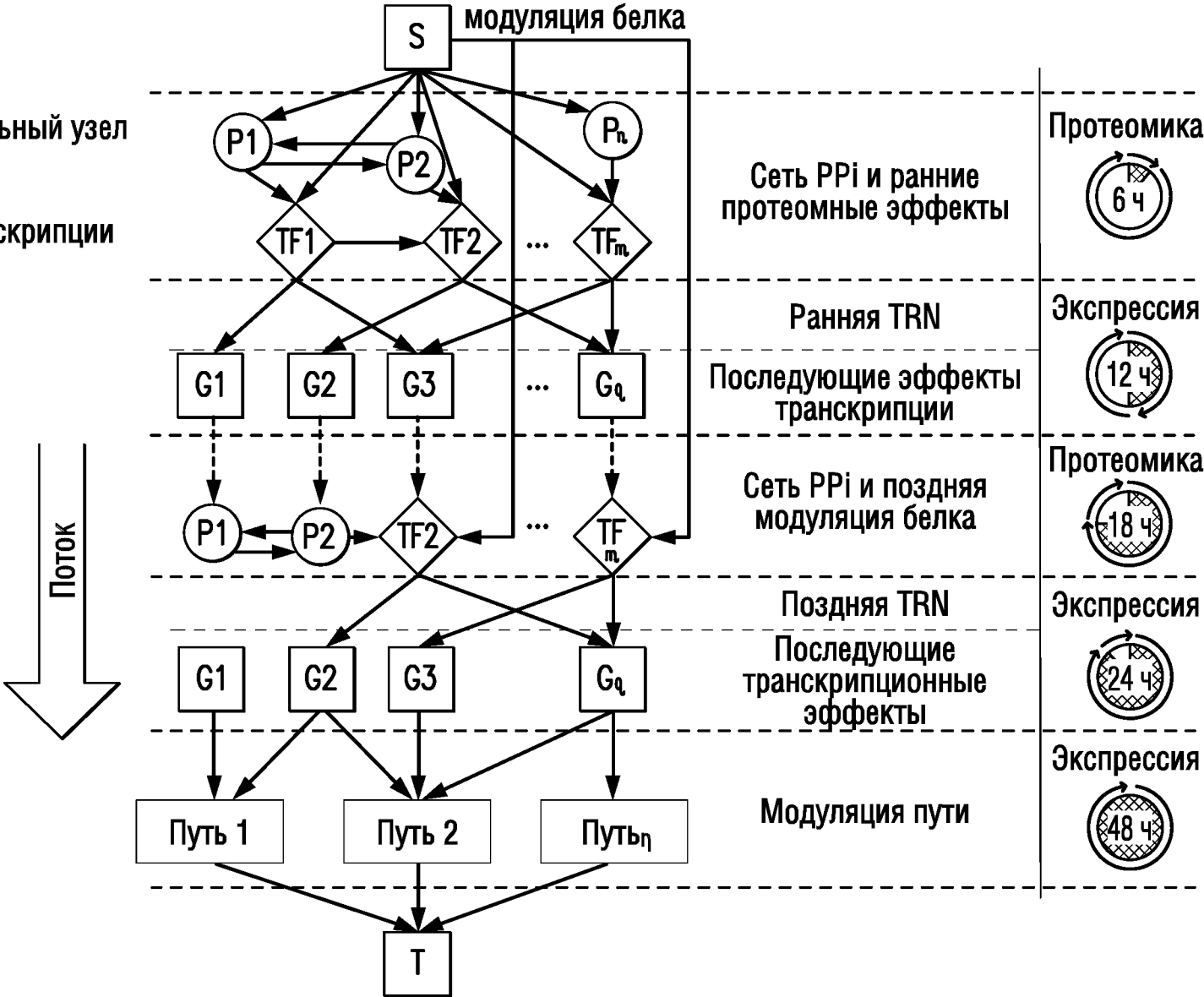


ФИГ.23

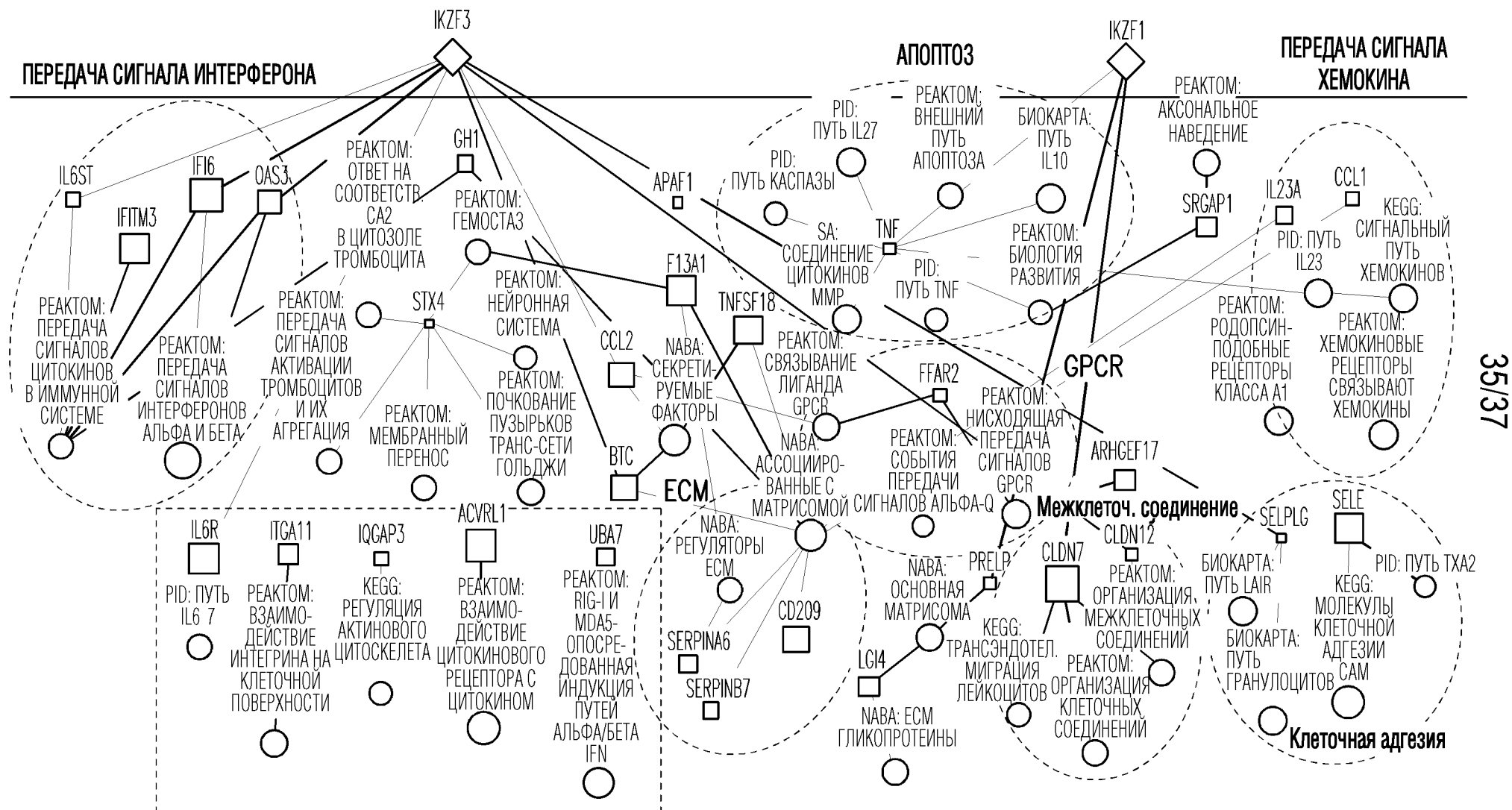


ФИГ.24

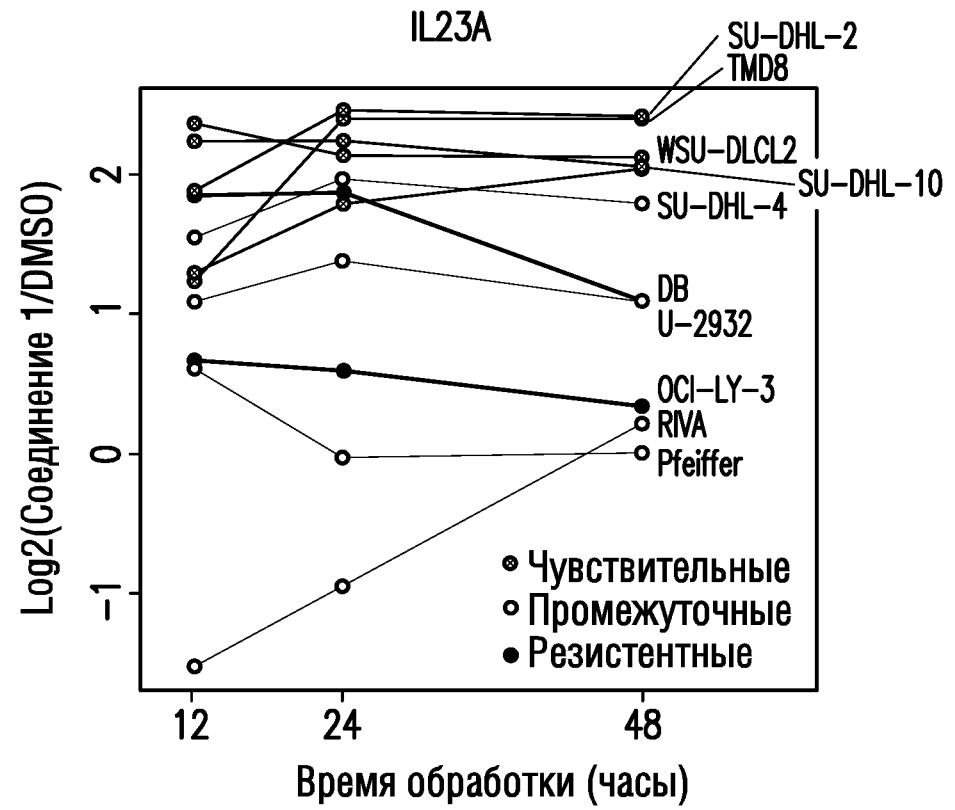
- Вспомогательный узел
- Белок
- ◇ Фактор транскрипции
- Ген
- Путь



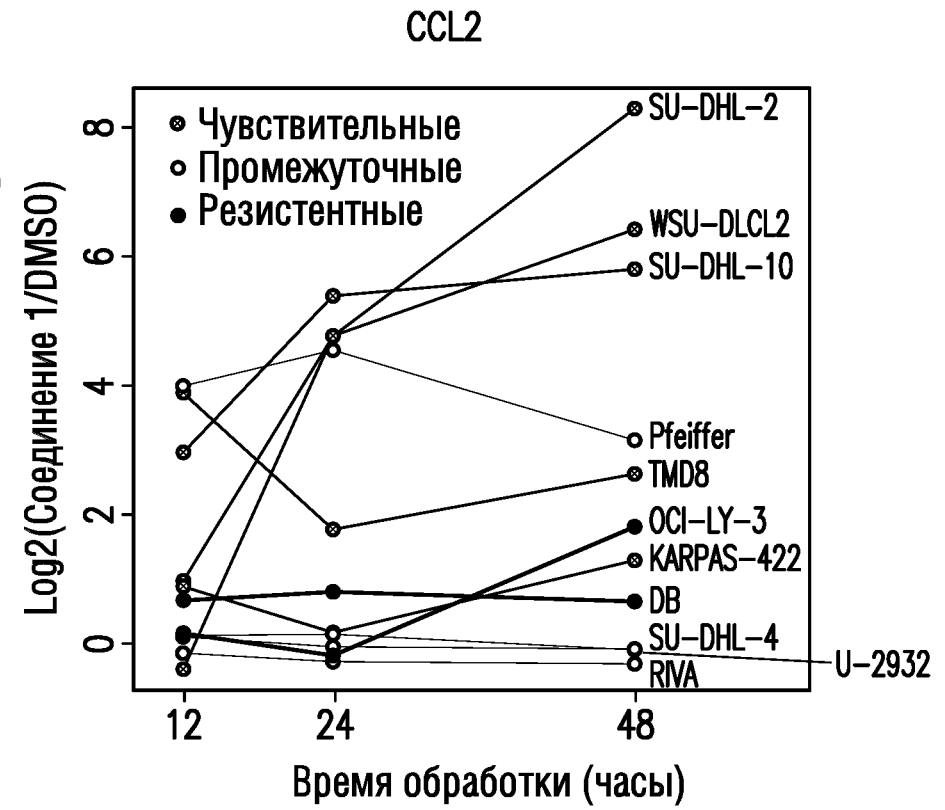
ФИГ.25



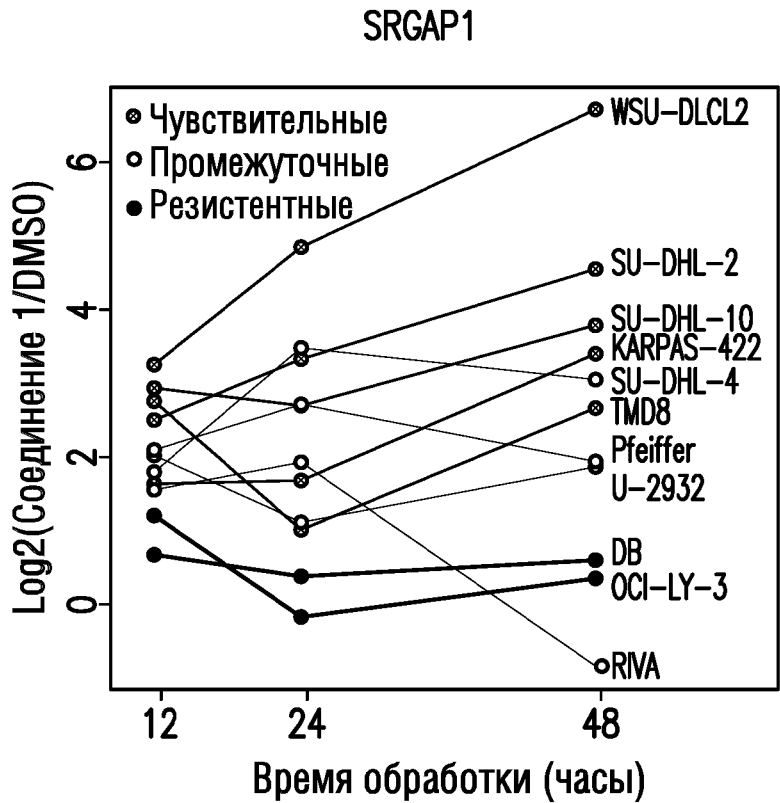
ФИГ.26А



ФИГ.26В



ФИГ.26С



ФИГ.27

