



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2018.09.28
- (21) Номер заявки
201490814
- (22) Дата подачи заявки
2012.10.18
- (51) Int. Cl. **A61K 31/4166** (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ ИНГИБИТОРАМИ TOR-КИНАЗЫ

- (31) **61/549,034; 61/591,401; 61/647,233;
61/653,436**
- (32) **2011.10.19; 2012.01.27; 2012.05.15;
2012.05.31**

(33) **US**

(43) **2014.09.30**

(86) **PCT/US2012/060723**

(87) **WO 2013/059396 2013.04.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**СИГНАЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:

**Сюй Шуйчань, Хедж Кристен Мей,
Лопес-Хирона Антония, Рэймон
Хитер, Нарла Рама К., Чопра Раджеш
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

- (56) **US-A1-2009023724
WO-A1-2011097333
WO-A2-2010068483
US-A1-2006106022
US-A1-2004213757
WO-A2-2008016669**

**DEBORAH S. MORTENSEN ET AL.:
"Discovery and SAR exploration of a
novel series of imidazo[4,5-
pyrazin-2-ones as potent and
selective mTOR kinase inhibitors",
BIOORGANIC & MEDICINAL
CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON,
ELSEVIER SCIENCE,**

**GB, vol. 21, no. 22, 12 September 2011 (2011-09-12),
pages 6793-6799, XP028320739, ISSN: 0960-894X,
DOI: 10.1016/J.BMCL.2011.09.035 [retrieved on
2011-09-16] tables 1-6**

**COSTA ET AL.: "Aspects of mTOR biology
and the use of mTOR inhibitors in non-Hodgkin's
lymphoma", CANCER TREATMENT REVIEWS,
SAUNDERS, US, vol. 33, no. 1, 26 January 2007
(2007-01-26), pages 78-84, XP005853740, ISSN:
0305-7372, DOI: 10.1016/J.CTRV.2006.10.004 the
whole document Discussion**

**P. FROST ET AL.: "AKT activity regulates the
ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis
and VEGF expression in multiple myeloma cells",
ONCOGENE, vol. 26, no. 16, 5 April 2007
(2007-04-05), pages 2255-2262, XP055052306,
ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/sj.one.1210019
abstract**

**JHANWAR-UNIYAL: "Involvement of
mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma
multiforme growth and motility", INTERNATIONAL
JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 35, no. 4, 1
September 2009 (2009-09-01), XP055052309, ISSN:
1019-6439, DOI: 10.3892/ijo_00000386 abstract**

WO-A1-2010062571

WO-A1-2011053518

WO-A1-2010056311

WO-A1-2012016113

**DEBORAH S. MORTENSEN ET AL.:
"Use of core modification in the discovery of
CC214-2, an orally available, selective inhibitor
of mTOR kinase", BIOORGANIC & MEDICINAL
CHEMISTRY LETTERS, vol. 23, no. 6, 1 March
2013 (2013-03-01), pages 1588-1591, XP055063965,
ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.01.110
the whole document**

- (57) В описании изобретения раскрыт способ лечения солидной опухоли у пациента, включающий введение эффективного количества 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиримидин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера пациенту, страдающему солидной опухолью. Также раскрыт способ получения полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания у пациента, страдающего солидной опухолью.

1. Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем описании раскрыт способ лечения солидной опухоли у пациента, включающий введение эффективного количества ингибитора TOR-киназы, а именно 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера, пациенту, страдающему солидной опухолью. В настоящем описании также раскрыт способ получения полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания у пациента, страдающего солидной опухолью.

2. Предшествующий уровень техники

На протяжении более 20 лет известна связь между аномальным фосфорилированием белка и причиной или следствием заболеваний. Таким образом, протеинкиназы стали очень важной группой мишеней лекарственных средств. См. Cohen, *Nature*, 1:309-315 (2002). В клинической практике используют различные ингибиторы протеинкиназы для лечения широкого спектра заболеваний, таких как злокачественная опухоль и хронические воспалительные заболевания, включая диабет и инсульт. См. Cohen, *Eur. J. Biochem.*, 268:5001-5010 (2001), *Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Disease: The Promise and the Problems*, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer Berlin Heidelberg, 167 (2005).

Протеинкиназы представляют собой большое и разнообразное семейство ферментов, которые катализируют фосфорилирование белка и играют важную роль в клеточной сигнализации. Протеинкиназы могут оказывать положительное или отрицательное регуляторное действие, зависящее от их белка-мишени. Протеинкиназы участвуют в специфических путях передачи сигнала, которые регулируют функции клетки, включая, но, не ограничиваясь ими, такие как, метаболизм, прохождение клеточного цикла, клеточная адгезия, функция сосудов, апоптоз и ангиогенез. Нарушение функционирования клеточной сигнализации связывали со многими заболеваниями, наиболее охарактеризованные из которых включают злокачественную опухоль и диабет. Хорошо документально подтверждена регуляция передачи сигнала цитокинами и ассоциация сигнальных молекул с протоонкогенами и генами-супрессорами опухоли. Аналогично, была продемонстрирована связь диабета и родственных патологических состояний с нерегулируемыми уровнями протеинкиназ. См., например, Sridhar et al., *Pharmaceutical Research*, 17(11): 1345-1353 (2000). Вирусные инфекции и связанные с ними патологические состояния также связывали с регуляцией протеинкиназ. Parked et al., *Cell*, 101 (7): 777-787 (2000).

Вследствие того, что протеинкиназы регулируют практически каждый клеточный процесс, включая метаболизм, клеточную пролиферацию, клеточную дифференцировку и выживание клетки, они являются привлекательными мишенями для терапевтического вмешательства для различных состояний болезни. Например, подавление клеточного цикла и ангиогенез, в которых протеинкиназы играют основную роль, представляют собой клеточные процессы, ассоциированные с рядом состояний заболеваний, таких как, но, не ограничиваясь ими, злокачественная опухоль, воспалительные заболевания, аномальный ангиогенез и связанные с ним заболевания, атеросклероз, дегенерация желтого пятна, диабет, ожирение и боль.

Протеинкиназы стали привлекательными мишенями для лечения злокачественных опухолей. Fabbro et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 93:79-98 (2002). Было сделано предположение, что вовлеченность протеинкиназ в развитие злокачественных новообразований человека может происходить путем: (1) геномной перестройки (например, BCR-ABL при хроническом миелогенном лейкозе), (2) мутаций, приводящих к активности конститутивно активной киназы, такой как острый миелогенный лейкоз и опухоли желудочно-кишечного тракта, (3) нарушения регуляции киназной активности в результате активации онкогенов или потери функций, опухоль-супрессорных функций, таких как при злокачественных опухолях с онкогенными RAS, (4) нарушения регуляции киназной активности в результате сверхэкспрессии, как в случае EGFR, и (5) эпителиальной экспрессии факторов роста, которые могут способствовать развитию и поддержанию неопластического фенотипа. Fabbro et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 93:79-98 (2002).

Выяснение запутанных каскадов реакций протеинкиназы и сложности взаимосвязи и взаимодействия среди различных каскадов реакций протеинкиназы и киназы и между ними подчеркивает важность разработки фармацевтических средств, способных действовать как модуляторы, регуляторы или ингибиторы протеинкиназ, которые оказывают благоприятное действие на многие киназы или многие киназные каскады реакций. Таким образом, сохраняется потребность в новых модуляторах киназы.

Белок, называемый mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих), который также называют FRAP, RAFTI или RAPT1), представляет собой Ser/Thr протеинкиназу длиной 2549 аминокислот, для которой было показано, что она представляет собой один из наиболее важных белков в каскаде реакций mTOR/PI3K/Akt, который регулирует клеточный рост и пролиферацию. Georgakis and Younes, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 6(1): 131-140 (2006). mTOR существует в виде двух комплексов mTORC1 и mTORC2. В то время как mTORC1 является чувствительным к аналогам рапамицина (таким как темсиролимус или эверолимус), mTORC2, главным образом, является нечувствительным к рапамицину. Следует отметить, что рапамицин не является ингибитором TOR-киназы. Для лечения злокачественной опухоли в клинических испытаниях оценивали или оценивают несколько ингибиторов mTOR. В 2007 г. был одобрен темсиролимус для применения при почечно-клеточной карциноме и в 1999 г. был одобрен сиролимус для профилактики отторжения почечного трансплантата. В 2009 г. был одобрен эверолимус для пациентов с почечно-клеточной карциномой, у которых отмечали прогрессирование с ингибиторами ре-

цептора фактора роста эндотелия сосудов, в 2010 г. для субэпендимальной гигантоклеточной астроцитомы (SEGA), ассоциированной с туберозным склерозом (TS) у пациентов, которым необходима терапия, но которые не являются кандидатами для хирургического удаления, и в 2011 г. для прогрессирующих нейроэндокринных опухолей панкреатического происхождения (PNET) у пациентов с неоперабельным, местно-распространенным или метастатическим заболеванием. Сохраняется потребность в ингибиторе TOR-киназы, который ингибирует комплексы mTORC1 и mTORC2.

Цитирование или определение какого-либо ссылочного документа в разделе 2 настоящей заявки не следует рассматривать как допущение, что ссылочный документ представляет собой известный уровень техники для настоящей заявки.

3. Сущность изобретения

В настоящем описании раскрыт способ лечения солидной опухоли, включающий введение эффективного количества 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера пациенту, страдающему солидной опухолью. Причем солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких или рак молочной железы, и солидная опухоль является устойчивой к рапамицину.

В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предоставлен способ получения полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания, как определено критериями оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), у пациента, включающий введение эффективного количества 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера пациенту, страдающему солидной опухолью. Причем солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких или рак молочной железы, и солидная опухоль является устойчивой к рапамицину.

Настоящие варианты осуществления будут более полно понятны посредством ссылки на подробное описание и примеры, которые предназначены для иллюстрации неограничивающих вариантов осуществления.

4. Подробное описание

4.1. Определения

Как используют в настоящем описании, термин "фармацевтически приемлемая соль(и)" относится к соли, получаемой из фармацевтически приемлемой нетоксической кислоты или основания, включая неорганическую кислоту и основание и органическую кислоту и основание. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований ингибитора TOR-киназ включают, но не ограничиваются ими, соли металлов, получаемые из алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка, или органические соли, получаемые из лизина, N,N'-добензилэтилендиамин, хлорпрокаина, холина, диэтанолamina, этилендиамин, меглумина (N-метилглюкамина) и прокаина. Подходящие нетоксические кислоты включают, но не ограничиваются ими, неорганические и органические кислоты, такие как уксусная, альгиновая, антралиловая, бензолсульфоновая, бензойная, камфорсульфоновая, лимонная, этенсульфоновая, муравьиная, фумаровая, фуранкарбонная, галактуронозная, глюконозная, глюкуронозная, глутаминовая, гликолевая, бромистоводородная, соляная, изетионовая, молочная, малеиновая, яблочная, миндальная, метансульфоновая, муциновая, азотная, памовая, пантотеновая, фенилуксусная, фосфорная, пропионовая, салициловая, стеариновая, янтарная, сульфаниловая, серная, винная кислота и паратолуолсульфоновая кислота. Конкретные нетоксические кислоты включают соляную, бромистоводородную, фосфорную, серную и метансульфоновую кислоты. Примеры конкретных солей, таким образом, включают гидрохлоридные и мезилатные соли. Другие соли хорошо известны в данной области, см., например, 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).

Как используют в настоящем описании и, если не указано иное, термин "стереоизомер" или "стереоизомерно чистый" означает один стереоизомер ингибитора TOR-киназы, который по существу не содержит других стереоизомеров этого соединения. Например, стереоизомерно чистое соединение, содержащее один хиральный центр, по существу не содержит противоположный энантиомер соединения. Стереоизомерно чистое соединение, содержащее два хиральных центра, по существу не содержит другие диастереомеры соединения. Характерное стереоизомерно чистое соединение содержит более приблизительно 80% по массе одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 20% по массе других стереоизомеров соединения, более приблизительно 90% по массе одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 10% по массе других стереоизомеров соединения, более приблизительно 95% по массе одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 5% по массе других стереоизомеров соединения или более приблизительно 97% по массе одного стереоизомера соединения и менее приблизительно 3% по массе других стереоизомеров соединения. Ингибиторы TOR-киназы могут содержать хиральные центры и могут существовать в виде рацематов, индивидуальных энантиомеров или диастереомеров и их смесей. Все такие изомерные формы входят в объем вариантов осуществления, описываемых в настоящем описании, включая их смеси. Использование стереоизомерно чистых форм таких ингибиторов TOR-киназы, а также использование смесей таких форм входит в объем вариантов осуществления, описываемых в настоящем описании. Например, в способах и композициях, описываемых в настоя-

шем описании, можно использовать смеси, содержащие эквивалентные или неэквивалентные количества энантиомеров конкретного ингибитора TOR-киназы. Эти изомеры можно получать асимметричным синтезом или разделять стандартными способами, такими как хиральные колонки или средства для 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) и 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).

Также следует отметить, что ингибиторы TOR-киназы могут содержать E- и Z-изомеры или их смесь и цис- и транс-изомеры или их смесь. В определенных вариантах осуществления ингибиторы TOR-киназы выделяют в виде цис- и транс-изомера. В других вариантах осуществления ингибиторы TOR-киназы представляют собой смесь цис- и транс-изомеров.

Термин "эффективное количество" применительно к ингибитору TOR-киназы означает количество, способное полностью или частично ослаблять симптомы, ассоциированные с солидной опухолью (например, нейроэндокринной опухолью, немелкоклеточным раком легких, мультиформной глиобластомой, печеночно-клеточной карциномой, раком молочной железы, колоректальным раком, раком слюнных желез, раком поджелудочной железы, аденокарциномой раком или злокачественной опухолью надпочечников), неходжкинской лимфомой или множественной миеломой, или замедлять или останавливать дальнейшее прогрессирование или усугубление таких симптомов, или обеспечивать лечение или профилактику солидной опухоли (например, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы) у индивидуума, страдающего или подвергающегося риску развития солидной опухоли. Эффективное количество ингибитора TOR-киназы, например, в фармацевтической композиции, может находиться на уровне, который оказывает желаемое действие, например, приблизительно от 0,005 мг/кг массы тела индивидуума приблизительно до 100 мг/кг массы тела пациента, в единице дозирования для перорального и парентерального введения. Как будет понятно специалистам в данной области, предполагают, что эффективное количество ингибитора TOR-киназы, описываемого в настоящем описании, может изменяться в зависимости от тяжести симптома, подлежащего лечению.

Термины "пациент" и "индивидуум", как используют в настоящем описании, включает животное, включая, но, не ограничиваясь ими, животное, такое как корова, обезьяна, лошадь, овца, свинья, курица, индейка, перепел, кошка, собака, мышь, крыса, кролик или морская свинка, в одном из вариантов осуществления млекопитающее, в другом варианте осуществления человека. В одном из вариантов осуществления "пациент" или "индивидуум" представляет собой человека, страдающего солидной опухолью. В одном из вариантов осуществления "пациент" или "индивидуум" представляет собой пациента, страдающего раком молочной железы, который ранее подвергался мастэктомии или который ранее получал один или более следующих ниже видов терапии: химиотерапию (включая дополнительную химиотерапию (AC)) (например, доксорубицином, амрубицином, циклофосфамидом, винорелбином, метотрексатом или 5-фторурацилом), терапию таксанами (например, доцетакселом или паклитакселом), терапию модуляторами ER-рецепторов (например, тамоксифеном или фулвестрантом), терапию агонистом гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) (например, Lupron®), терапию антителом, направленным к рецептору HER2/neu (например, трастузумабом), терапию ингибитором фактора роста эндотелия сосудов A (например, бевацизумабом), терапию ингибитором ароматазы (например, анастрозолом, летрозолом или экземестаном), терапию mAb против IGFR, терапию ингибитором PI3K, терапию гемцитабином, терапию ингибитором Mek, терапию ингибитором cMet (например, ARC197), терапию ингибитором PI3K/mTog (например, XL765), терапию капецитабином или дистанционную лучевую терапию всей молочной железы (WB XRT).

В отношении солидной опухоли (в частности, немелкоклеточного рака легких и рака молочной железы) лечение можно оценивать наряду с другими по ингибированию или замедлению прогрессирования заболевания, ингибированию роста опухоли, уменьшению или регрессии первичной и/или вторичной опухоли(ей), ослаблению, связанных с опухолью симптомов, улучшению качества жизни, ингибированию секретируемых опухолью факторов (включая секретируемые опухолью гормоны, такие как гормоны, которые способствуют карциноидному синдрому), снижению маркеров эндокринных гормонов, (например, хромогранина, гастринина, серотонина и/или глюкагона), позднему появлению или рецидиву первичной и/или вторичной опухоли(ей), замедленному развитию первичной и/или вторичной опухоли(ей), сниженной частоте появления первичной и/или вторичной опухоли(ей), замедленной или уменьшенной тяжести вторичные последствия заболевания, блокированному росту опухоли и/или регрессии опухолей, увеличенному времени до прогрессирования (TTP), увеличенной выживаемости без прогрессирования (PFS), увеличенной общей выживаемости (OS). OS, как используют в настоящем описании, означает период времени от момента рандомизации до смерти по любой причине, и ее измеряют в популяции всех пациентов, участвующих в лечении. TTP, как используют в настоящем описании, означает период времени от момента рандомизации до объективного прогрессирования опухоли, TTP не включает смертность. Как используют в настоящем описании, PFS означает период времени от момента рандомизации до объективного прогрессирования опухоли или смерти. В одном из вариантов осуществления показатели PFS количественно оценивают с использованием оценок Каплана-Мейера.

В определенных вариантах осуществления лечение солидных опухолей можно оценивать посредством критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1) (см. Thereasse P. et al., New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. J. of the National Cancer Institute, 2000, (92) 205-216 и Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J. et al., New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). European J. Cancer, 2009; (45) 228-247). Все ответы для всех возможных комбинаций ответов опухолей в целевой и нецелевом очагах с появлением новых очагов или без них являются таким, как указано ниже:

Целевые очаги	Нецелевые очаги	Новые очаги	Общий ответ
CR	CR	нет	CR
CR	неполный ответ/SD	нет	PR
PR	не-PD	нет	PR
SD	не-PD	нет	SD
PD	любые	да или нет	PD
любые	PD	да или нет	PD
любые	любые	да	PD

CR = полный ответ; PR = частичный ответ; SD = стабильное заболевание; и PD = прогрессирующее заболевание.

В отношении оценки целевых очагов полный ответ (CR) представляет собой исчезновение всех целевых очагов, частичный ответ (PR) представляет собой по меньшей мере 30% снижение суммы наибольшего диаметра целевых очагов, принимая в качестве эталонной величины исходную сумму наибольшего диаметра, прогрессирующее заболевание (PD) представляет собой по меньшей мере 20% увеличение суммы наибольшего диаметра целевых очагов, принимая в качестве эталонной величины наименьшую сумму наибольшего диаметра, зарегистрированного после начала лечения, или появление одного или более новых опухолевых очагов, и стабильное заболевание (SD) представляет собой как отсутствие достаточного уменьшения размера для того, чтобы квалифицировать как частичный ответ, так и достаточного увеличения, чтобы квалифицировать как прогрессирующее заболевание, принимая в качестве эталонной величины наименьшую сумму наибольшего диаметра после начала лечения.

В отношении оценки нецелевых очагов полный ответ (CR) представляет собой исчезновение всех нецелевых очагов и нормализацию уровня опухолевых маркеров; неполный ответ/стабильное заболевание (SD) представляет собой персистирование одного или более нецелевых очагов и/или сохранение уровня опухолевых маркеров выше нормальных границ, и прогрессирующее заболевание (PD) представляет собой появление одного или более новых опухолевых очагов и/или однозначное прогрессирование существующих нецелевых очагов.

Измеряемые очаги повреждения. Измеряемые очаги повреждения представляют собой накапливающие контрастное вещество очаги повреждения, которые можно измерять в двухмерном режиме. Измерение состоит из максимального диаметра накапливающей контрастное вещество опухоли (также известного как наибольший диаметр, LD). Наибольший перпендикулярный диаметр измеряют на том же самом изображении. Перекрытие двухмерных измерений должно перекрываться, и вычисляют произведение этих диаметров.

Минимальный диаметр. T1-взвешенное изображение, в котором участки составляют 5 мм с шагом 1 мм. Минимальный LD измеряемого очага устанавливают как 5 мм на 5 мм. Наибольшие диаметры могут являться необходимыми для включения и/или обозначения как целевые очаги. После определения исходного уровня целевые очаги, которые становятся меньше, чем минимальная величина, необходимая для измерения, или становятся больше не поддающимися двухмерному измерению, регистрируют как значение по умолчанию 5 мм для каждого диаметра менее 5 мм. Очаги, которые исчезают, регистрируют как 0 мм на 0 мм.

Многофокусные очаги. Очаги, которые считают многофокусными (в противоположность неразрывным), представляют собой очаги, где нормальная ткань головного мозга находится между двумя (или более) очагами. Для многофокусных очагов, которые представляют собой отдельные очаги накопления контрастного вещества, подход основан на отдельном измерении накапливающего контрастного вещества очага, который соответствует критериям включения. Если не встречается нормальной ткани головного мозга между двумя (или более) очагами, их считают одним и тем же очагом.

Неизмеряемые очаги. Все очаги, которые не соответствуют критериям для измеряемого заболевания, как определено выше, считают неизмеряемыми очагами, а также все не накапливающие контраст и другие действительно неизмеряемые очаги. Неизмеряемые очаги включают очаги усиления контраста, которые составляют менее чем определяемый наименьший диаметр (т.е. менее 5 мм на 5 мм), не накап-

ливающие контраст очаги (например, как видно на T1-взвешенных изображениях после введения контрастного вещества, T2-взвешенных изображениях или инверсии-восстановления с ослаблением сигнала от жидкости [FLAIR]), геморрагические или преимущественно кистозные или некротические очаги и лептоменингеальную опухоль.

Геморрагические очаги, как правило, имеют характерную T1-взвешенную гиперинтенсивность, которую можно неправильно интерпретировать как накапливающая контрастное вещество опухоль, и по этой причине можно анализировать T1-взвешенные изображения до введения контрастного вещества для исключения исходного уровня или внутренних подострых кровотечений.

На исходном уровне очаги классифицируют, как указано ниже: Целевые опухолевые очаги: в качестве целевых очагов можно выбирать до 5 измеряемых очагов, где каждый является измеряемым по меньшей мере 10 мм на 5 мм, характерного заболевания индивидуума; нецелевые очаги: все другие очаги, включая все неизмеряемые очаги (включая масс-эффекты и результаты T2/FLAIR) и любой измеряемый очаг, невыбранный в качестве целевого очага. На исходном уровне целевые очаги следует измерять, как описано в определении для измеряемых очагов, и необходимо определять SPD всех целевых очагов. Наличие всех других очагов необходимо документировать. При оценке в период после лечения сохраняют исходную классификацию очагов как целевых и нецелевых очагов и документируют очаги и описывают соответствующим способом в течение периода времени (например, регистрируют в том же порядке в исходных документах и eCRF). Для длительного исследования все измеряемые и неизмеряемые очаги необходимо оценивать одним и тем же способом как на исходном уровне (например, получение изображений у индивидуумов необходимо проводить на одном и том же МРТ-сканере или по меньшей мере с одинаковой величиной магнитного поля), чтобы уменьшить трудности интерпретирования изменений. При каждой оценке измеряют целевые очаги и вычисляют SPD. Качественно оценивают нецелевые очаги и отдельно документируют новые очаги при наличии. При каждой оценке для целевых очагов, нецелевых очагов и нового очага определяют ответ в определенный момент времени. Прогрессирование опухоли можно устанавливать, даже если оценивают подгруппу очагов. Однако если не наблюдают прогрессирования, объективный статус (стабильное заболевание, PR или CR) можно определять только, когда оценивают все очаги.

Оценки подтверждения для всех ответов в определенные моменты времени CR и PR проводят в соответствии со следующей оценкой по плану, но подтверждение можно не получать, если интервал между сканирования составляет <28 суток. Лучший ответ, включающий требуемые параметры подтверждения, получают из серии из определенных моментов времени.

В определенных вариантах осуществления лечение солидной опухоли (немелкоклеточного рака легких или рака молочной железы) можно оценивать по ингибированию фосфорилирования S6RP, 4E-BP1 и/или АКТ в циркулирующей крови, и/или в опухолевых клетках, и/или биопсиях кожи, или биопсиях/аспиратах опухоли до, во время и/или после лечения заявленным ингибитором TOR-киназы. Например, ингибирование фосфорилирования S6RP, 4E-BP1 и/или АКТ оценивают в В-клетках, Т-клетках и/или моноцитах. В других вариантах осуществления лечение солидной опухоли (немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы) можно оценивать по ингибированию активности ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) в образцах кожи и/или биопсиях/аспиратах опухоли, таким образом, как посредством оценки количества S2056 фосфоДНК-ПК в качестве биомаркера путей повреждения ДНК, до, во время и/или после лечения заявленным ингибитором TOR-киназы.

4.2. Краткое описание чертежей

На фиг. 7А проиллюстрирована активность соединения 1 в различных подтипах (ER+/Her2-, ER+/Her2+, ER-/Her2+ и тройном негативном (TN)) линий клеток рака молочной железы. На фиг. 7В проиллюстрирована корреляция чувствительности соединения 1 к статусу ER, HER, PIK3CA и TP53 в линиях клеток рака молочной железы.

На фиг. 8 проиллюстрированы эффекты соединения 1 на пролиферацию линий клеток с различной чувствительностью к рапамицину.

На фиг. 9 проиллюстрирована противоопухолевая активность соединения 1 на модели немелкоклеточного рака легких NCI-H441.

На фиг. 21 проиллюстрированы исходные характеристики индивидуумов группы А.

На фиг. 22 проиллюстрирована схема ускоренного (1+5) повышения дозы часть А и определение DLT.

На фиг. 23 проиллюстрированы наиболее частые побочные эффекты, связанные с соединением 1, (общая частота возникновения >20%) и все связанные события с 3/4 степенью (N=28).

На фиг. 24 проиллюстрированы ассоциированные с гипергликемией повышения уровней инсулина и С-пептида.

На фиг. 25 проиллюстрировано средние (\pm SD) равновесные концентрации в плазме для соединения 1 на 15 сутки у являющихся человеком индивидуумов.

На фиг. 26 проиллюстрировано дозозависимое ингибирование сигнального каскада TOR в крови являющихся человеком индивидуумов.

На фиг. 27А и 27В проиллюстрирован рентгенологический ответ для пациента, страдающего

ER+/Her2-раком молочной железы. У этого индивидуума продемонстрировали 30% уменьшение целевых очагов при первом повторном определении стадии после 2 циклов терапии.

На фиг. 28 проиллюстрированы ответы целевых очагов (n=19; 9 индивидуумов без повторного определения стадии (7 досрочно отстраненных/PD; 1 несоответствующий требованиям; 1 с миеломой)).

На фиг. 29 проиллюстрированы уровень дозирования, продолжительность лечения и лучший общий ответ (n=27*).

4.3 Ингибиторы tor-киназы

Соединения, предоставленные в настоящем описании, как правило, обозначают как "ингибитор(ы) TOR-киназы". В конкретном варианте осуществления ингибиторы TOR-киназы не включают рапамицин или аналоги рапамицина (рапалоги).

В более конкретном варианте осуществления характерный ингибитор TOR-киназы представляет собой соединение 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-он, и его фармацевтически приемлемые соли стереоизомеры.

4.4. Способы получения ингибитора TOR-киназы

Ингибиторы TOR-киназы можно получать стандартным, хорошо известным способом синтеза, см., например, March, J. *Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms, and Structure*, 4th ed., 1992. Таким образом, исходные вещества, пригодные для получения соединений формулы (III) и промежуточных соединений являются коммерчески доступными, или их можно получать из коммерчески доступных веществ способами синтеза и с использованием синтетических реагентов.

Конкретные способы получения соединений формулы (I) описаны в патенте США № 7981893, опубликованном 19 июля 2011 года, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. Конкретные способы получения соединений формулы (II) описаны в патенте США № 7968556, опубликованном 28 июня 2011 года, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. Конкретные способы получения соединений формулы (III) и (IV) описаны в публикации США № 2010/0216781, зарегистрированной 26 октября 2009 года, и публикации США № 2011/0137028, зарегистрированной 25 октября 2010 года, полностью включенных в настоящее описание посредством ссылки.

4.5. Способы применения

В настоящем описании предоставлены способ лечения солидной опухоли, включающий введение эффективного количества ингибитора TOR-киназы, а именно 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пиразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера, пациенту, страдающему солидной опухолью. Причем солидная опухоль является устойчивой к рапамицину.

В одном из вариантов осуществления солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

В другом варианте осуществления солидная опухоль представляет собой рак молочной железы. В одном из вариантов осуществления рак молочной железы является эстроген-рецептор-положительным (ER+, ER+/Her2- или ER+/Her2+). В одном из вариантов осуществления рак молочной железы является эстроген-рецептор отрицательным (ER-/Her2+). В одном из вариантов осуществления рак молочной железы является тройным негативным (TN) (раком молочной железы, при котором не экспрессируются гены и/или белок, соответствующий рецептору эстрогена (ER), рецептор прогестерона (PR), и при котором не сверхэкспрессируется белок Her2/neu).

В одном из вариантов осуществления в настоящем описании предоставлен способ получения полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания, как определено критериями оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), у пациента, включающий введение эффективного количества заявленного ингибитора TOR-киназы пациенту, страдающему солидной опухолью.

В одном из вариантов осуществления ингибитор TOR-киназы представляет собой соединение 1 (указанный в настоящем описании ингибитор TOR-киназы с молекулярной формулой C₂₁H₂₇N₅O₃). В одном из вариантов осуществления соединение 1 представляет собой 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-((1R,4R)-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино-[2,3-b]пиразин-2(1H)-он.

5. Примеры

5.1. Биологические примеры

5.1.1. Биохимические анализы

Анализ HTR-FRET mTOR. Ниже приведен пример анализа, который можно использовать для определения активности ингибирования TOR-киназы тестируемого соединения. Ингибиторы TOR-киназы растворяли в DMSO и получали в виде 10 мМ исходных растворов, и разбавляли соответствующим образом для экспериментов. Реагенты получали так, как указано ниже.

"Простой буфер TOR" (используемый для разбавления фракции TOR с высоким содержанием глицина): 10 мМ Tris pH 7,4, 100 мМ NaCl, 0,1% Tween-20, 1 мМ DTT. В этом буфере разбавляли mTOR от Invitrogen (кат. №PV4753) до анализируемой концентрации 0,200 мкг/мл.

Раствор АТФ/субстрат: 0,075 мМ АТФ, 12,5 мМ MnCl₂, 50 мМ Hepes, pH 7,4, 50 мМ β-GOP, 250 нМ микроцистин-LR, 0,25 мМ EDTA, 5 мМ DTT и 3,5 мкг/мл GST-p70S6.

Раствор реагента для детекции: 50 мМ HEPES, pH 7,4, 0,01% Triton X-100, 0,01% BSA, 0,1 мМ

EDTA, 12,7 мкг/мл Cy5- α GST Amersham (кат. №PA92002V), 9 нг/мл α -фосфо-p70S6 (Thr389) (Cell Signaling Mouse Monoclonal №9206L), 627 нг/мл α -mouse Lance Eu (Perkin Elmer кат. №AD0077).

К 20 мкл простого буфера mToг добавляют 0,5 мкл тестируемого соединения в DMSO. Для инициации реакции добавляли 5 мкл раствора АТФ/субстрат к 20 мкл раствора простого буфера TOR (контроль) и к получаемому выше раствору соединения. Анализ останавливали через 60 мин добавлением 5 мкл 60 мМ раствора EDTA, затем добавляли 10 мкл раствора реагента для детекции и оставляли смесь осаждаваться в течение по меньшей мере 2 ч перед анализом на микропланшетном спектрофотометре Perkin-Elmer Envision, настроенном для детекции LANCE Eu TR-FRET (возбуждение при 320 нм и испускание при 495/520 нм).

В анализе HTR-FRET mToг тестировали ингибиторы TOR-киназы и было выявлено, что в нем они обладают активностью, где определенные соединения обладали в анализе IC_{50} менее 10 мкМ, где некоторые соединения обладают IC_{50} от 0,005 нМ до 250 нМ, другие обладают IC_{50} от 250 нМ до 500 нМ, другие обладают IC_{50} от 500 нМ до 1 мкМ, и другие обладают IC_{50} от 1 мкМ до 10 мкМ.

Анализ ДНК-ПК. Анализы ДНК-ПК проводили способами, предоставляемыми в наборе Promega DNA-ПК assay (каталожный №V7870). Фермент ДНК-ПК приобретали от Promega (Promega кат. №V5811).

Выбранные TORKi обладают, или предполагают, что они обладают, IC_{50} менее 10 мкМ в этом анализе, где некоторые TORKi обладают IC_{50} менее 1 мкМ, и другие обладают IC_{50} менее 0,10 мкМ.

5.1.2. Основанные на клетках анализы

Вещества и способы. Линии клеток и культура клеток: линии клеток глиобластомы человека и рака легких приобретают от Американской коллекции типовых культур (АТСС) и поддерживают в RPMI 1640 плюс 10% телячьей сыворотки (ЭТС) или в рекомендуемой специальной среде для культивирования. Клетки немелкоклеточного рака легких могут включать следующие линии клеток: NCI-H460, NCI-H838, NCI-H1792, NCI-H520, NCI-H1993, NCI-H1944, NCI-H1975, NCI-H1395, A549, NCI-H2122, NCI-H1703, NCI-H1299, NCI-H647, NCI-H358, SK-LU-1, NCI-H1734, NCI-H1693, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H2030, NCI-H1755, Calu-6, Calu-1, SW1573, NCI-H2009, NCI-H441, HOP92, NCI-H2110, NCI-H727, NCI-H1568, Calu-3, NCI-H2228, NCI-H2444, NCI-H1563, NCI-H1650, NCI-H1437, NCI-H650, NCI-H1838, NCI-H2291, NCI-H28 и NCI-H596. Дополнительные линии клеток, на которых можно тестировать ингибиторы TOR-киназы, включают HT-3, HeLaSF, HeLa S3, SKG-IIIa, SiHa, MS751, BOKU, C-33-A, C-4-II, Ca-Ski, DoTc2-4510, ME-180, OMC-1, SW756 и TC-YIK.

Линии клеток глиобластомы, получаемые, например, от АТСС (например, клетки A-172, T98G, DBTRG-05MG, M059K, M059J, LN18, LN-229, TIME, G44 и U87 MG, U-118 MG, U-138 MG) можно конструировать известными в данной области способами таким образом, чтобы они экспрессировали мутацию EGFRvIII или сверхэкспрессировали EGFR. Линии клеток также можно конструировать, чтобы они экспрессировали EGFRvIII или сверхэкспрессировали EGFR и одновременно экспрессировали PTEN. Кроме того, линии клеток со сверхэкспрессией EGFR и мутацией EGFRvIII можно выводить из опухолей человека (образцов пациента). (См. например, A. Lai et al., *Cancer Res.*, 62:3335 (2002), J.J. Kelly et al., *Stem Cells*, 27(8): 1722 (2009), M.Y. Wang et al., *Cancer Res.*, 66:7864 (2006)).

Анализ выживаемости клеток для линий NSCLC. Выживаемость клеток оценивали с использованием Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability от Promega. Анализ представляет собой гомогенный способ определения количества жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения содержащегося аденозинтрифосфата (АТФ), показателя метаболически активных клеток. Способ гомогенного анализа включает добавление одного реагента (реагент Cell Titer-Glo) непосредственно в клетки, культивируемые в среде с добавлением сыворотки. Клетки высевали на 96-луночный плоскодонный планшет (Costar каталожный номер 33595) в плотностях, которые предварительно оптимизировали для каждой линии клеток. Клетки инкубировали в течение ночи в 5% CO_2 при 37°C. На следующие сутки получали разбавления соединения и анализировали все концентрации в трех повторениях. Клетки инкубировали с соединением 1 (0,03 мкМ, 0,1 мкМ, 0,3 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 10 мкМ и 30 мкМ для клеток NSCLC) в 5% CO_2 при 37°C в течение 3 суток. После инкубационного периода в течение 3 суток к каждой лунке добавляли 100 мкл реагента Cell Titer-Glo в течение 2 минут при перемешивании и дополнительно инкубировали в течение 10 минут (без перемешивания) при комнатной температуре для стабилизации сигнала. Люминесценцию измеряли на многофункциональном планшетном анализаторе VICTOR X2. Процент ингибирования роста рассчитывали с использованием ответа в контроле DMSO в том же планшете (без соединения) как 100% клеточный рост. Среднее значение трех повторений наносили на график для получения значений IC_{50} с использованием программного обеспечения XLfit от IDBS. Формула, используемая для определения IC_{50} в XLfit, представляла собой модель номер 205, в которой используют логистическую модель с 4 параметрами или сигмоидальную модель зависимости доза-эффект для вычисления значений IC_{50} . Все значения IC_{50} представлены в виде среднего значения двух независимых экспериментов или одного эксперимента. Результаты для соединения 1 для выбранных линий клеток NSCLC приведены в табл. 1.

Таблица 1

линия клеток NSCLC	IC ₅₀ мкМ
NCI-H1568	0.226
NCI-H2228	0.264
NCI-H727	0.288
Calu-3	0.302
NCI-H460	0.37
NCI-H838	0.39
NCI-H2110	0.456
линия клеток NSCLC	IC ₅₀ мкМ
NCI-H520	0.499
NCI-H520	0.50
NCI-H1993	0.50
NCI-H1792	0.54
NCI-H1944	0.55
NCI-H1395	0.60
NCI-H549	0.77
NCI-H2444	0.778
NCI-H2122	0.90
NCI-H1703	0.92
NCI-H1975	0.96
NCI-H1437	0.975
NCI-H1299	1.23
NCI-H647	1.36
NCI-H358	1.42
SK-LU-1	1.44
NCI-H1734	1.55
NCI-H1693	1.58
NCI-H226	1.75
HOP62	2.007
NCI-H596	2.196
NCI-H23	2.21
NCI-H2030	2.23
NCI-H1755	3.03
Calu-6	4.52
Calu-1	4.74
SW1573	7.21
NCI-H2009	26.01
NCI-H441	>30
HOP92	>30
NCI-H1563	>30
NCI-H1650	>30
NCI-H1838	>30
NCI-H2291	>30
NCI-H28	>30
NCI-H650	>30

Анализ ингибирование роста рака молочной железы (BC) (соединение 1). Все линии клеток рака молочной железы поддерживали и тестировали в подходящих средах для культивирования. Плотность высевания для каждой линии клеток оптимизировали для обеспечения линейной зависимости анализа в 384-луночных планшетах.

Увеличивающиеся концентрации соединения 1 наносили посредством звукового дозатора (EDC ATS-100) в пустой 384-луночный планшет. Соединение 1 наносили на планшет в виде 10-точечного серийного разведения (3-кратное разбавление) в двух повторениях. Концентрацию диметилсульфоксида (DMSO) сохраняли постоянной в виде конечной анализируемой концентрации 0,1% DMSO. Повторно получали планшеты для использования с различными линиями клеток и периодами тестирования. После повторного получения планшетов с соединением все планшеты герметизировали (Agilent ThermoLoc) и хранили при -20°C до 1 месяца. Когда все было готово для тестирования, планшеты извлекали из морозильной камеры, оттаивали и распечатывали непосредственно перед добавлением тестируемой клетки.

Перед тестированием во флаконах для культивирования выращивали и размножали клетки для обеспечения достаточных количеств исходного вещества. Затем клетки разбавляли до желаемых величин их плотности и непосредственно добавляли в 384-луночный планшеты с нанесенным соединением 1. Клетки оставляли расти в течение 96 часов при 37°C/5% CO₂. В момент времени внесения (to) оценивали исходное количество клеток посредством анализа выживаемости (Cell Titer-Glo) и снимали показания люминесценции. Через 96 часов оценивали выживаемость клеток, обработанных соединением 1, посредством Cell Titer-Glo и снимали показания люминесценции.

Линии клеток анализировали в отношении ингибирования роста соединением 1 по меньшей мере в двух независимых тестах. Все данные нормализовали и представляли в виде процента от обработанных DMSO контрольных клеток. Затем результаты выражали в виде GI₅₀, что представляет собой концентрацию соединения, которая необходима для ингибирования роста клеток в обработанных клетках до 50% роста необработанных контрольных клеток во время 96 часов обработки (табл. 6). Активность соединения 1 в линиях клеток различных подтипов рака молочной железы представлена на фиг. 7А, тогда как корреляция чувствительности соединения 1 к статусу ER, HER, PIK3CA и TP53 представлена на фиг. 7В. Как можно видеть из данных, активность соединения 1 строго коррелирует с люминальным типом клеток в раке молочной железы.

Таблица 6

Линия клеток рака молочной железы	ER	Her2	Молекул. подтип	Подтип опухоли	PTEN	PIK3CA	TP53	GI ₅₀ (мкМ)	SD
BT-483	+	-	Люминальный	ER+	+	E542K	M246I или mut	0.0217	
HCC1500	+	-	Люминальный	ER+	+	WT	WT	0.0248	0.0045
ZR-75-1	+	-	Люминальный	ER+	-	WT	WT	0.0321	0.0098
MDA-MB-175-VII	+	-	Люминальный	ER+	+	WT	WT	0.0408	0.0332
T47D	+	-	Люминальный	ER+	+	H1047R	L194F	0.0553	0.0196
EFM-19	+	-	Люминальный	ER+	+	H1047L	H193R	0.0572	0.0171
KPL-1	+	-	Люминальный	ER+	+	E545K	WT	0.0973	0.0071
HCC1428	+	-	Люминальный	ER+	+	WT	WT	0.0984	0.0095
MDA-MB-134-VI	+	-	Люминальный	ER+	+	WT	E285K или WT	0.101	0.0423
CAMA-1	+	-	Люминальный	ER+	+	WT	R280T	0.1458	0.0899
MDA-MB-415	+	-	Люминальный	ER+	-	WT	Y236C	0.1691	0.0192
MCF7	+	-	Люминальный	ER+	+	E545K	WT	0.1807	0.0909
HCC202	-	+	Люминальный	Her2+	+	E545K	283>FS	0.0201	0.0196
UACC-812	+	+	Люминальный	Her2+	+	WT	WT	0.0478	0.016
ZR-75-30	+	+	Люминальный	Her2+	+	WT	WT	0.0634	0.0098
MDA-MB-361	+	+	Люминальный	Her2+	+	E545K, K567R	E56X или S166* или WT	0.0657	0.0345

SK-BR-3	-	+	Люми- нальный	Her2+	+	WT	R175H	0.1212	0.0553
MDA-MB-453	-	+	Люми- нальный	Her2+	+	H1047R	H368del или WT	0.1432	0.0295
EFM-192A	+	+	Люми- нальный	Her2+	+	C420R	270fs	0.1922	0.0375
HCC1954	-	+		Her2+	+	H1047R	Y163C	0.1972	0.0899
AU565	-	+	Люми- нальный	Her2+	+	WT	R175H или WT	0.213	
BT-474	+	+	Люми- нальный	Her2+	+	K111N or WT	E285K	0.2261	
HCC1569	-	+	Базальный	Her2+	-	WT	E294* и 227fs	0.3557	0.3023
MCF12A	-	-	Базальный	TN	+	WT	unk	0.0444	0.0221
CAL-51	-	-	Базальный	TN	-	E542K	WT	0.119	0.0224
MCF10A	-	-	Базальный	TN	+	WT	WT	0.1471	0.172
BT-549	-	-	Базальный	TN	-	WT	R249S	0.1492	0.104
HCC70	-	-	Базальный	TN	-	WT	R248Q или WT	0.1716	0.1492
MDA-MB-435	-	-	Базальный	TN	-	WT	G266E	0.222	0.1168
CAL-85-1	-	-	Базальный	TN	+	WT	K132E	0.253	0.0027
BT-20	-	-	Базальный	TN	-	H1047R and P539R	K132Q или WT	0.33	
HCC1143	-	-	Базальный	TN	+	WT	R248Q или WT	0.3427	0.2513
HS578T	-	-	Базальный	TN	+	WT	V157F	0.3429	0.0046
HCC2157	-	-	Базальный	TN	-	WT	R248W или WT	0.3992	0.322
HCC1187	-	-	Базальный	TN	+	WT	G108del	0.5674	0.2614
HCC1937	-	-	Базальный	TN	-	WT	R306*	0.697	0.3973
CAL-120	-	-	Базальный	TN	+	WT	mut или WT	0.7002	0.0835
MDA-MB-231	-	-	Базальный	TN	+	WT	R280K	0.7105	0.0544
NCI/ADR-RES	-	-	Базальный	TN	+	WT	unk	0.9441	0.2325
DU4475	-	-	Базальный	TN	-	WT	WT	1.2392	0.5476
MDA-MB-468	-	-	Базальный	TN	-	WT	R273H	1.8556	0.038
HCC38	-	-	Базальный	TN	-	WT	R273L	2.9544	0.0419
MDA-MB-436	-	-	Базальный	TN	-	WT	R273H или 202fs	2.9873	0.018
MDA-MB-157	-	-	Базальный	TN	+	WT	A88fs*52 или S261del	4.341	1.1704

ER = эстрогеновый рецептор;

Her2 = рецептор эпидермального фактора роста 2 человека;

TN = тройной негативный (эстроген-рецептор-отрицательный, прогестерон-рецептор-отрицательный, рецептор эпидермального фактора роста 2 человека-отрицательный);

WT = статус дикого типа;

Mut = мутант;

Unk = неизвестный;

SD = стандартное отклонение.

Анализ ингибирования роста для линии клеток с различной чувствительностью к рапамицину (соединению 1). Клетки высевали в 96-луночные планшеты в плотности, определяемой для каждой линии клеток, и обрабатывали на следующие сутки соединением 1 в диапазоне концентраций. Клетки инкубировали в течение 3 суток при 37°C, а затем к каждой лунке добавляли 20 мл WST-1 (Roche) для PC-3, A549, HCT 116, U87-MG, MDA-MB-231 и NCI-H23 или 100 мл реагента Cell Titer-Glo (Promega) для NCI-H460, T47D и проводили анализ в соответствии с протоколами производителя. Процент ингибирования при каждой концентрации соединения нормализовали на значения контроля DMSO. Процент ингибирования определяли для каждого повторения, а затем получали среднее 3 значений для каждой 3 серии лунок в трех повторениях. Все данные анализировали с использованием XLfit от IDBS. Формула, используемая для определения IC₅₀ в XLfit, представляла собой модель номер 205, в которой используют логистическую модель с 4 параметрами или сигмоидальную модель зависимости доза-эффект для вычисления значений IC₅₀. Значения IC₅₀ приведены в виде среднего.

Эффекты рапамицина на пролиферацию, как правило, выходили на плато в большинстве линий клеток. Чувствительность к рапамицину определяли по уровню ингибирования, в случае если возникает такое плато, и оценивали, как указано ниже: чувствительные 100-55% ингибирования; частично чувствительные 54-31% ингибирования и нечувствительные 0-30%. Как можно видеть на фиг. 8, соединение 1 проявляет эффективное ингибирование клеточного роста, включая все типы, которые являются частично чувствительными или нечувствительными к рапамицину.

5.1.3. Анализы in vivo

Модель роста опухоли NCI-H441 NSCLC in vivo. Исследование с использованием ксенотрансплантата проводили на мышах, несущих опухоль NCI-H441. Мышам SCID подкожно инокулировали клетки NCI-H441 в область паха выше правой задней конечности. После инокуляции животных перед случайным распределением опухоли оставляли расти приблизительно до 100 мм³. На 14 сутки после инокуляции опухолевых клеток мышей, несущих опухоли NCI-H441 в диапазоне от 87 до 136 мм³, объединяли вместе и распределяли в случайном порядке на различные группы лечения. Соединение 1 формулировали в 0,5% СМС и 0,25% Tween 80 в воде (в виде суспензии). Животным перорально вводили носитель (СМС-Tween) или соединение 1 два раза в сутки (BID) в течение 26 суток. Дозы соединения 1 находились в диапазоне от 1 до 10 мг/кг. Положительный контроль рапамицином (4 мг/кг, один раз в 3 суток) вводили интраперитонеальным (и/п) путем. Рапамицин получали в виде раствора в 2% этаноле, 45% полиэтиленгликоле 400 и 53% физиологическом растворе. Опухоли измеряли два раза в неделю с использованием штангенциркулей и рассчитывали объемы опухолей с использованием формулы $W^2 \times L/2$. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Даннетта с контрольной группой, получавшей обработку носителем. Результаты приведены на фиг. 9, где показано, что Соединение 1 значительно ингибировало рост опухоли NCI-H441 NSCLC in vivo.

Оценка in vivo соединения 1 на моделях опухолевого трансплантата низкого пассажа немелкоклеточного рака легких (NSCLC). Задачей исследования являлась оценка эффективности соединения 1, вводимого в качестве единственного средства, на моделях немелкоклеточного рака легких (NSCLC).

Противоопухолевую активность соединения 1 оценивали на моделях опухолевых трансплантатов низкого пассажа немелкоклеточного рака легких (NSCLC). Опухолевые трансплантаты получали путем прямого имплантирования фрагментов опухоли человека мышам с ослабленным иммунитетом, а затем пассировали in vivo. Опухоли из этих первичных опухолевых трансплантатов сохраняли биологические и морфологические характеристики исходных опухолей человека. Противоопухолевую активность соединения 1 оценивали при трех уровнях дозирования (1,5 и 10 мг/кг) при дозировании один раз в сутки в течение 28 суток. Во время исследования противоопухолевую активность оценивали путем измерения опухолей. Соединение 1 значительно ингибировало рост первичного опухолевого трансплантата NSCLC in vivo.

5.2. Клинические исследования

5.2.1. Мультицентровое открытое исследование 1/2 фазы по подбору дозы для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и предварительной эффективности соединения 1, вводимого перорально индивидуумам с солидными опухолями на поздней стадии, неходжкинской лимфомой или множественной миеломой

Соединение 1 вводят перорально индивидуумам с солидными опухолями, неходжкинской лимфомой или множественной миеломой. Исследование планируют в виде испытания 1/2 фазы, состоящего из двух частей: повышения дозы (часть А) и оптимизации дозы (часть В).

Соединение 1 вводят перорально для определения безопасной и переносимой дозы и для определения непереносимой дозы (NTD) и максимальной переносимой дозы (MTD).

Оценки включают степень ингибирования фосфорилирования S6RP (Ser235/236 и/или Ser240/244) и/или 4EB-P1 (Thr37/46) для активности mTORC1 и АКТ (Ser473) и/или других релевантных биомаркеров активности mTORC2 в образцах периферической крови и биопсиях опухоли после лечения соединением 1 и степень эффективности соединения 1.

Исследуемая популяция состоит из мужчин и женщин в возрасте 18 лет или старше с NHL, MM,

нейроэндокринными опухолями на поздней стадии развития (последние также включают индивидуумов в возрасте 12 лет или старше) или неоперабельными солидными опухолями на поздней стадии, включая индивидуумов, у которых отмечали прогрессирование (или которые неспособны переносить) при стандартной терапии или для которых не существует стандартной противоопухолевой терапии.

Для обеих частей повышения дозы и оптимизации дозы этого протокола критерии включения представляют собой: (1) понятый и добровольно подписанный документ информированного согласия до проведения любых связанных с исследованием оценок/процедур; (2) мужчины и женщины в возрасте 18 лет или старше с гистологически или цитологически подтвержденной NHL, ММ на поздней стадии или неоперабельными солидными опухолями на поздней стадии, включая индивидуумов, у которых отмечали прогрессирование (или которые неспособны переносить) при стандартной противоопухолевой терапии или для которых не существует стандартной противоопухолевой терапии; (3) оценки общего состояния согласно Восточной объединенной онкологической группе (ECOG) PS 0 или 1 для индивидуумов с солидными опухолями и 0-2 для гематологических злокачественных новообразований; (4) индивидуумы должны иметь следующие данные лабораторных анализов: абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1,5 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин (Hgb) ≥ 9 г/дл, тромбоциты (plt) $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$, калий в пределах нормы или корректируемый добавками, AST/SGOT и ALT/SGPT $\leq 2,5 \times$ верхняя граница нормы (ULN) или $\leq 5,0 \times$ ULN при наличии опухоли печени, сывороточный билирубин $\leq 1,5 \times$ ULN или $\leq 2 \times$ ULN при наличии опухоли печени, сывороточный креатинин $\leq 1,5 \times$ ULN или 24-часовой клиренс ≥ 50 мл/мин, отрицательный тест на беременность сыворотки или мочи в течение 48 ч до начала исследуемого вида лечения у женщин детородного возраста, и (5) способность соблюдать схему визитов исследования и другие требования протокола.

Для части оптимизации дозы (части B) этого протокола критерии включения представляют собой: (1) получение фиксированных в формалине, погруженных в парафин (FFPE) архивных образцов опухолевой ткани в виде блоков опухоли или нарезанных на срезы/приготовленных препаратов для анализа мутации генов и/или анализа ИНС биомаркеров для всех опухолей за исключением ММ. Только в исключительных случаях для других типов опухолей спонсор может давать согласие на отказ от исключения; (2) Достаточный скрининг биопсии для генной мутации и/или ИНС анализа биомаркеров для доступных опухолей для всех опухолей за исключением NSCLC и NET (необязательно) и GBM; (3) Гистологически подтвержденные опухоли следующих ниже типов, все с измеряемым заболеванием. Конкретные для типов критерии представляют собой в дополнение к указанным выше критериям или вместо них, где они применимы: (a) мультиформную глиобластому (GBM) или глиосаркому, за исключением олигоастроцитомы IV степени ВОЗ (для которой ранее проводили лечение, включая облучение и/или химиотерапию, где облучение завершали >12 недель до 1 суток; запланированная "спасительная" хирургическая резекция опухоли на сутки 15 ± 7 суток, для которой предполагают удаление ≥ 200 мг опухолевой ткани; отсутствие введенного ранее или запланированного имплантата Gliadel® wafer, за исключением тех случаев, когда область оценки и планируемая резекция находится вне области, в которой ранее проводили имплантацию; отсутствие интерстициальной брахитерапии или стереотаксической радиохирургии, за исключением тех случаев, когда область оценки и планируемая резекция находится вне области, для которой ранее проводили лечение; отсутствие содержащих фермент противосудорожных лекарственных средств (EIAED), таких как карбамазепин, фенитоин, фенобарбитал или примидон, за 14 суток до суток 1; способность подвергаться повторным сканированиям магнитно-резонансной томографии (МРТ); возможность получения соответствующего архивного образца вещества опухоли FFPE (для биомаркеров PD); (b) печеночно-клеточную карциному (НСС) (подсчет тромбоцитов $\geq 60 \times 10^9/\text{л}$ при наличии портальной гипертензии; классификация по Чайльду-Пью менее чем 10 (т.е. функционирование печени класса В печень или лучше); по меньшей мере 4 недели после последней дозы α -интерферона и/или рибавирина; по меньшей мере 4 недели после вводимой ранее чрескожной инъекции этанола, радиочастотной абляции, трансартериальной эмболизации или криотерапии с документированием прогрессирования или рецидива заболевания); (c) желудочно-кишечную нейроэндокринную опухоль (NET), не относящуюся к поджелудочной железе, (местно неоперабельную или умеренно метастатическую, или хорошо дифференцированную, низкой (степени 1) или средней (степени 2) степени злокачественности, не относящуюся к поджелудочной железе NET кишечного происхождения или неизвестной первичной; исключают панкреатическую, бронхиальную и другую NET с происхождением в органах выше диафрагмы (например, гортани, глотки, щитовидной железы), феохромоцитомы, параганглиомы, аденокарциному и карциноидные опухоли из бокаловидных клеток и слабодифференцированные, с высокой степенью злокачественности (например, мелкоклеточные или крупноклеточные); индивидуумов в возрасте 12 лет или старше; включают симптоматические гормонально-активные или неактивные опухоли; необходима сопутствующая терапия аналогами (индивидуум должен получать стабильную дозу в течение по меньшей мере двух месяцев с документированным прогрессирующим заболеванием на терапии); рентгенологическое подтверждение прогрессирования заболевания в течение 12 месяцев до цикла 1, 1 сутки; отсутствие направленной на рецептор терапии с радиоактивной меткой в течение 3 месяцев до цикла 1, 1 сутки; отсутствие направленной на печень терапии с течение 4 недель до цикла 1, сутки 1, за исключение случаев, когда существует очаг измеряемого заболевания отличный от очага, для которого проводят лечение; в этой

когорте скрининг и биопсия опухолей во время исследования являются необязательными; следует проводить сбор архивных образцов опухоли, но необязательно в этой когорте); (d) гормональный рецептор-положительный рак молочной железы (HRPBC) (неоперабельную местнораспространенную или метастатическую карциному молочной железы; ER-позитивную и HER2/neu-отрицательную (0 или 1+) опухоль; измеряемое заболевание согласно RECIST v1.1; необходимо получение по меньшей мере одной до линии гормональной терапии или по меньшей мере одного года терапии на основе ароматазы в сочетании со вспомогательными средствами, или шесть месяцев терапии ингибиторами ароматазы для метастатического заболевания; в стабильных дозах допустимы бисфосфонаты или деносуаб; когорту можно увеличивать для включения как минимум 5 индивидуумов, каждый с опухолями, содержащими мутации PIK3CA); (e) множественную миелому (ММ) (измеряемые уровни миеломного парапротеина в сыворотке ($>0,5$ г/дл) или моче ($>0,2$ г выделившегося за 24 ч собранного образца); абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1,0 \times 10^9$ /л; тромбоциты (plt) $\geq 60 \times 10^9$ /л у индивидуумов, у которых $<50\%$ мононуклеарных клеток костного мозга представляют собой плазматические клетки, или $\geq 30 \times 10^9$ /л у индивидуумов, у которых $\geq 50\%$ мононуклеарных клеток костного мозга представляют собой плазматические клетки); (f) диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (гистологически подтвержденную диффузную В-крупноклеточную неходжкинскую лимфому; тромбоциты (plt) $\geq 60 \times 10^9$ /л для индивидуумов, у которых $<50\%$ мононуклеарных клеток костного мозга представляют собой лимфомные клетки, или $\geq 30 \times 10^9$ /л для индивидуумов, у которых $>50\%$ мононуклеарных клеток костного мозга представляют собой лимфомные клетки; по меньшей мере 4 недели от последней дозы терапевтических глюкокортикостероидов; допустимы заместительные дозы глюкокортикостероидов при надпочечниковой недостаточности (до эквивалентного количества 10 мг ежедневно преднизона)).

Для обеих частей повышения дозы и оптимизации дозы этого протокола критерии исключения представляют собой: (1) манифестирующие метастазы в центральной нервной системе (за исключением GBM; допускаются индивидуумы с метастазами в головном мозге, которые ранее получали лечение и являются стабильными в течение 6 недель); (2) известный острый или хронический панкреатит; (3) индивидуумов с любой периферической нейропатией ≥ 2 степени CTCAE NCI; (4) индивидуумов с упорной диареей или синдромом пониженного всасывания ≥ 2 степени CTCAE NCI, несмотря на лечение; (5) нарушенную сердечную функцию или клинически значимые заболевания сердца, включая любое из следующих ниже: LVEF $<45\%$, как определено сканированием MUGA или ECHO, полную блокаду левой ножки предсердно-желудочкового пучка или бифасцикулярную блокаду, врожденный синдром удлинения интервала QT, хроническую или клинически значимую желудочковую аритмию или фибрилляцию предсердий, QTcF >460 миллисекунд на ЭКГ скрининге (среднее значение записей в трех повторениях), нестабильную стенокардию или инфаркт миокарда ≤ 3 месяцев до начала введения соединения 1, другое клинически значимое заболевание сердца, такое как застойная сердечная недостаточность, требующая лечения, или неконтролируемая гипертензия (артериальное давление $\geq 160/95$ мм рт.ст.); (6) индивидуумов с диабетом на активном лечении или индивидуумов с любым из следующих паразитов: (a) уровень глюкозы в крови натощак ≥ 126 мг/дл (7,0 ммоль/л) или (b) HbA1c $\geq 6,5\%$; (7) другие конкурирующие тяжелые и/или неконтролируемые сопутствующие медицинские состояния (например, активная или неконтролируемая инфекция), которые могут вызывать неприемлемые риски безопасности или нарушать соблюдение протокола; (8) ≤ 5 периодов полувыведения или 4 недели перед системным направленным на злокачественную опухоль лечением или исследовательскими видами лечения, независимо от того, какой является корочке, до начала введения исследуемого лекарственного средства, или тех, кто не восстановился от побочных эффектов такой терапии; (9) индивидуумов, которые претерпели полостную операцию за ≤ 2 недели до начала введения исследуемого лекарственного средства, или которые не восстановились от побочных эффектов такой терапии; (10) женщин, которые беременны или кормят грудью; взрослых репродуктивного возраста, не использующих две формы контроля рождаемости: (a) женщины, способные к деторождению, должны соглашаться использовать одновременно две подходящие формы способов контрацепции (один из них должен быть негормональным) от момента времени подписания информированного согласия до срока 28 суток после последней дозы соединения 1. Женщины, способные к деторождению, определяемые как половозрелые женщины, которые не подвергались гистерэктомии или двусторонней овариэктомии, или которые не находились в состоянии естественной менопаузы (т.е. у которых полностью отсутствовала менструация) в течение по меньшей мере 24 последовательных месяцев; (b) мужчины (с партнерами, которые представляют собой женщин, способных к деторождению, должны соглашаться, что они и их партнеры используют по меньшей мере два эффективных способа контрацепции (включая один барьерный способ) при поддержании сексуальной активности с возможностью зачатия на всем протяжении исследования, и избегают зачатия в течение 28 суток после принятия последней дозы соединения 1; (11) индивидуумов с известной инфекцией ВИЧ; (12) известную хроническую инфекцию вирусом гепатита В или С (HBV/HCV), за исключением случаев сопутствующего заболевания у индивидуумов с НСС; (13) любое значимое медицинское состояние, отклонения от нормы в лабораторных анализах или психическую болезнь, которая препятствует индивидууму участвовать в исследовании; (14) любое состояние, включая наличие отклонений от нормы лабораторных анализов, которое подверга-

ет индивидуума неприемлемому риску, если он/она собиралась участвовать в исследовании; (15) любое состояние, которое затрудняет возможность интерпретации данных исследования.

Для части оптимизации дозы (части В) этого протокола критерии исключения представляют собой: (1) сопутствующее активное второе злокачественно новообразование, от которого пациент получает терапию, за исключением немеланомного рака кожи или карциномы *in situ* шейки матки.

Соединение 1 поставляют в соответствующих дозировках (например, 2,5 мг, 10 мг и 20 мг), содержащих только активный фармацевтический ингредиент в красновато-коричневых желатиновых капсулах для перорального введения. Не используют другие эксципиенты при получении капсул.

Соединение 1 вводят перорально по непрерывной схеме один раз в сутки без перерывов между циклами. Доза 7,5 мг/сутки соединения 1 в этом протоколе представляет собой начальную дозу. Каждую дозу принимают по утрам, где индивидуум воздерживается от пищи в течение ночи (минимально 6 часов). Потребление пищи откладывают по меньшей мере на один час после дозирования на сутки приема соединения 1 дома. На сутки визита в клинику соединение 1 вводят в клинику после проведения любых тестов перед приемом препарата. Пищу принимают после проведения всех тестов натощак, но в любом случае не ранее чем через 60 минут после дозирования (3 часа после дозирования на 8 сутки). В случае, когда причиняющие беспокойство симптомы GI, усталость или другие симптомы сохраняются после окончания цикла 1, дозирование можно переносить на конец суток, при условии, что индивидуум может сохранять перерыв по меньшей мере в 3 часа между последним приемом пищи и введением соединения 1. Соединение 1 можно принимать позже в срок до 12 часов, если дозирование отложили на одни сутки; в противном случае дозирование в эти сутки необходимо отменить.

В части А индивидуумы получают однократные и многократные возрастающие уровни дозирования соединения 1 для измерения фармакокинетики (PK) и идентификации максимальной переносимой дозы (MTD). Для определения начальной токсичности используют модифицированный план ускоренного титрования (Simon R., Freidlin B., Rubinstein L. et al., Accelerated Titration Designs for Phase I Clinical Trials in Oncology, Journal of the National Cancer Institute, (1997) Vol. 89, No. 15.). Во время ускоренного курса начальные когорты из одного индивидуума получают соединение 1 с шагом повышения дозы 100% до первого случая 2 степени или более высокой степени токсичности первого курса, в этот момент часть ускоренного повышения дозы завершают, и эту конкретную когорту увеличивают до 6 индивидуумов. Затем для определения непереносимой дозы (NTD) и MTD начинают стандартную повышающую схему дозирования с шагом повышения дозы приблизительно 50% и 6 индивидуумами в когорте. Также можно оценивать меньший шаг повышения дозы и дополнительных индивидуумов в когорте дозирования.

Предполагают, что доза является непереносимой, если 2 оцениваемых индивидуума в когорте дозирования испытывают ограничивающую дозу токсичность (DLT). Когда NTD определена, повышение дозы прекращают. MTD определяют как тестируемую последнюю дозу ниже NTD с 0 или 1 из 6 оцениваемых индивидуумов, испытывающих DLT во время цикла 1. Для более точного определения MTD необходимой может являться промежуточная доза (т.е. доза между NTD и последним уровнем дозирования до NTD) или дополнительные индивидуумы в любой когорте дозирования.

В части В индивидуумы могут начинать принимать соединение 1 при MTD и/или более низком уровне дозирования в зависимости от данных о безопасности, PK и PD из части А. Приблизительно 150 индивидуумов подвергаются лечению и оценки в отношении безопасности и предварительной противоопухолевой активности после каждых двух циклов терапии. Типы опухолей включают немелкоклеточный рак легких (NSCLC), мультиформную глиобластому (GBM), печеночно-клеточную карциному (HCC), желудочно-кишечную нейроэндокринную опухоль, не относящуюся к поджелудочной железе (NET), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), множественную миелому (MM) и гормональный рецептор-положительный рак молочной железы (HRPBC). В каждый тип опухоли включают до 20 индивидуумов.

Во время первого цикла только в части А индивидууму вводят однократную дозу соединения 1 (сутки -1) с последующим наблюдением в течение 48 часов и периодом взятия проб для PK с последующим на сутки 1 ежесуточным непрерывным дозированием в течение 28 суток (цикл 1=30 суток). В последующих циклах части А индивидуумы получают лечение в течение циклов длительностью 28 суток с непрерывным дозированием от 1 до 28 суток. В части В индивидуумы получают непрерывное дозирование в течение 28 суток от начала, отсутствует начальный период наблюдения в течение 48 ч или сбор образцов для PK.

Терапию можно прерывать, если наблюдают признаки прогрессирования заболевания, но индивидуумы могут продолжать получать соединение 1 при условии, что исследователь считает, что они получают положительный результат от лечения. Терапию прерывают, если существует неприемлемая токсичность, или если индивидуум решает выйти из исследования.

Когда показано снижение дозы, выбирают следующий более низкий уровень дозирования. Допустимыми являются два снижения дозы. Для начального уровня дозирования (7,5 мг) в части А снижение дозы проводят с шагом 2,5 мг. В части В начальный уровень дозирования составляет 45 мг один раз в сутки, допускают снижение дозы до 30 мг и 15 мг один раз в сутки. Если какой-либо индивидуум про-

должает испытывать неприемлемую токсичность после 2 снижений дозы в части А, введение соединения 1 окончательно прекращают. В части В индивидуумам можно снижать дозу до 2 уровней (т.е. до 15 мг) и вновь повышать, если это клинически приемлемо; допустимы последующие снижения дозы, в случае повторяющейся токсичности, но при таких обстоятельствах повторное повышение дозы является не допустимым.

Индивидуумов оценивают в отношении эффективности каждые 2 цикла до 6 цикла и каждые 3 цикла в дальнейшем. Первичная переменная эффективности представляет собой ответ. Во время скрининга проводят оценки опухолей, включая сканирование (СТ, МРТ и/или ПЕТ) грудной клетки и брюшной полости и других отделов при необходимости. Индивидуумам с очагами в головном мозге также проводят сканирование головного мозга при скрининге и во время последующих оценок опухоли. После скрининга проводят оценки опухоли (для всех опухолей за исключением множественной миеломы) по окончании циклов 2, 4 и 6 (т.е. на циклы 3, 5 и 7/сутки 1 ± 7 суток), а затем каждые 3 месяца в дальнейшем (например, цикл 10 и 13/сутки 1 ± 7 суток). Оценки опухоли (для множественной миеломы и только NHL/DLBCL с известным или предполагаемым поражением костного мозга) (аспирация и биопсия костного мозга, с анализом биомаркеров PD, цитогенетическим анализом, если при скрининге они являлись аномальными) проводят только по окончании циклов 4, 8, 12 и 16 (т.е. на циклы 5, 9, 13 и 17/сутки 1 ± 7 суток). Цитогенетические анализы не требуется повторять, если они являлись нормальными при скрининге. Ответ опухоли основан на критериях оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), международных экспертных критериях (IWC) для NHL/DLBCL или международных единых критериев ответа для множественной миеломы (IURC) и RANO для GBM с использованием пострезекционного МРТ-сканирования в качестве фонового уровня. Учитывая трудность в оценке ответа опухоли после "спасительной хирургической операции", первичная конечная точка эффективности для GBM представляет собой отношение индивидуумов без прогрессирования на 6 месяц от суток 1 к индивидуумам с оцениваемой эффективностью в типе GBM. Индивидуумов оценивают в отношении ответа опухоли по окончании 2, 4, 6 и т.д. Исследователь обеспечивает описательный анализ подтверждений противоопухолевой активности на основании клинических и рентгенологических оценок, которые включают оценку целевого очага, нецелевого очага, новых очагов и общий ответ.

Представляющая интерес переменная эффективности для части А представляет собой лучший общий ответ. Другие переменные предварительной эффективности суммируют с использованием табличных данных частот для категориальных переменных или описательной статистики для непрерывных переменных.

Для части В подлежащие анализу переменные эффективности включают ответ опухоли в конце лечения, соотношение индивидуумов, оставшихся в живых и без прогрессирования заболевания, и продолжительность ответа. Переменные эффективности полностью готовы, когда последнего индивидуума из группы или когорты оценки исключают из исследования или завершают 6 циклов.

Коэффициенты выживаемости без прогрессирования заболеваемости вычисляют с использованием оценок Каплана-Мейера. Также описывают продолжительность ответа у индивидуумов, которые отвечают, с использованием конкретных критериев оценки. В зависимости от типа опухоли предоставляют двусторонний 90% CI частоты ответов и частоты PFS в момент времени каждой запланированной оценки ответа (т.е. циклы 2, 4, 6 и т.д.).

Другие переменные предварительной эффективности, включая общее состояние ECOG, СТС и результаты ПЕТ, суммируют с использованием табличных данных частот для категориальных переменных или описательной статистики для непрерывных переменных.

Исследуемые параметры включают ингибирование биомаркеров mTOR в крови и опухоли, гистопатологический ответ, корреляции с фармакогенными результатами и процентом ингибирования фосфо-АКТ (Ser473), фосфо-S6RP (Ser235/236 и/или Ser240/244), фосфо-4EB-P1 (Thr37/46) и/или других подходящих биомаркеров в образцах периферической крови и опухоли, нежелательные явления и клинический исход. В это исследование включают измерения показателей фармакодинамики (PD) для оценки целевого ингибирования сигнальных путей mTORC1 и mTORC2, последствий такого ингибирования и взаимосвязи PK/PD. В частях А и В анализ биомаркеров включает измерение фосфо-АКТ (mTORC2) в белковых лизатах, получаемых из выделенных тромбоцитов. Уровни фосфо-4EB-P1 и фосфо-S6RP (mTORC1) и фосфо-АКТ (mTORC2) измеряют на проточной цитометрии с использованием образцов цельной крови. Аналогично, в частях А и В измеряют фосфо-АКТ, фосфо-4EB-P1, фосфо-S6, Ki67 и/или другие подходящие маркеры для оценки активности соединения 1 в серийных биопсиях опухоли у индивидуумов по возможности с доступным заболеванием. Изменения каждого биомаркера определяют, сравнивая уровни биомаркеров в образцах до лечения и после него, и по возможности устанавливают корреляцию этих уровней с концентрацией лекарственного средства в крови и ткани, если они доступны, и ответами опухолей в течение длительного периода времени. Полное подробное описание всех статистических анализов и моделирований таких исходов описаны в плане статистического анализа и заключительным отчете по исследованию.

Переменные безопасности для этого исследования представляют собой нежелательные явления,

клинические лабораторные переменные, ЭКГ в 12-ти отведениях (оцениваемые в центральной лаборатории), оценки LVEF, медицинские осмотры и показатели жизненно-важных функций. В части А решение об оценке более высокого уровня дозирования или о признании MTD принимает Комитет по рассмотрению вопросов безопасности (SRC) каждый раз, когда все данные о безопасности клинических и лабораторных анализов для данной когорты являются доступным для рассмотрения. SRC также определяет дозу, дозирование или план, подходящий для части В. Во время части В SRC продолжает регулярно анализировать данные о безопасности и выдает рекомендации о продолжительности исследования при необходимости.

В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, выявляют положительный ответ опухоли, такой как ингибирование роста опухоли или уменьшение размера опухоли. В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, выявляют улучшение состояния очагов в головном мозге, такое как уменьшение числа и размера. В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, обеспечивают критерии оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1) полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания. В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, предотвращают критерии оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1) прогрессирующего заболевания. В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, выявляют улучшение международных экспертных критериев (IWC) или международных единых критериев ответа для множественной миеломы (IURC). В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, выявляют улучшение критериев рабочей группы оценки ответа для нейроонкологии (RANO). В определенных вариантах осуществления у пациентов, к которым применяют клинический протокол, предоставленный в настоящем описании, выявляют улучшение общего статуса ECOG или результатов PET.

Измерения биомаркеров сигнального пути TOR в цельной крови. Образцы крови, получаемые из мест проведения клинического исследования, разделяли на аликвоты в 96-луночный планшет с глубоким дном в лунках и оставляли в течение 1 ч при 37°C. Образцы стимулировали антителом против IgD и LPS в течение 15 мин при 37°C. Эритроциты лизировали и лейкоциты фиксировали буфером Lyse/Fix BD при соотношении 15:1 буфера к крови в течение 10 мин при 37°C. Планшеты центрифугировали, аспирировали и добавляли 1 мл ледяного метанола к лункам, содержащим фиксированные лейкоциты, чтобы пермеабиллизировать клетки для внутриклеточного окрашивания. Планшеты хранили в течение ночи при -80°C. Планшеты размораживали, центрифугировали, аспирировали и дважды промывали PBS+0,5% BSA. Клетки окрашивали антителами, специфическими к поверхностным маркерам CD3, CD14 и CD19 и к маркерам сигнального пути mTOR, включая фосфо-S6 (S235/236), p4EBP1 (T37/46) и фосфо-AKT (S473). Клетки дважды отмывали PBS и фиксировали 1,6% PFA.

Анализ образцов: Образцы анализировали на цитометре с возможностью регистрации 8 цветов. При анализе образца во многих точках считывали данные контрольных лунок с многоцветными частицами с 8 пиками излучения (Spherotech Libertyville, IL). Для каждого маркера вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) на основании уровней интенсивности флуоресценции в Т-клетках, В-клетках и моноцитах. MFI нормализовали с использованием многоцветных частиц с 8 пиками излучения и представляли в виде ERF (эквивалентные числа эталонных флуорофоров). ERF рассчитывали из MFI с использованием линейного регрессионного преобразования, проводимого на двойной логарифмической шкале с использованием многоцветных калибровочных частиц с 8 интенсивностями по 8 цветам. Для каждого пациента определяли процент изменения от исходного уровня для фосфо-S6, p4EBP1 и фосфо-AKT в стимулированных и нестимулированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах. Исходная величина представляла собой среднее двух визитов (скрининга и цикла 1/сутки -1 при 0 часов перед дозированием), по мере доступности.

Часть А. Результаты ускоренного повышения дозы. Для 28 индивидуумов проводили лечение при 5 уровнях дозирования: 7,5 (n=1), 15 (n=2), 30 (n=9), 45 (n=7) и 60 мг (n=8). Исходные характеристики являлись характерными для онкологических испытаний 1 фазы. Хотя ECOG 2 являлась пониженной, >95% индивидуумов имели ECOG 0 или 1. В исследование включали различные типы опухолей с наибольшим преобладанием CRC, рака молочной железы и рака поджелудочной железы. Половина пациентов ранее получала более 3 видов терапии (см. фиг. 21).

Оценивали пять уровней дозирования. Впервые связанную со 2 степенью токсичность наблюдали на 3-ем уровне дозирования (30 мг) и в дальнейшем когорты увеличивали как минимум до 6 индивидуумов с 50% шагом повышения дозы. Дополнительных индивидуумов обратно включали во все когорты за исключением уровня дозирования 1. Гипергликемию 3 степени описывали как DLT при 30 мг и сыпь 3 степени как DLT при 45 мг. В результате этого модифицировали критерии DLT протокола, чтобы обеспечить возможность лечения сыпи и гипергликемии до того, как расценивать эти события как DLT у последующих пациентов. Усталость и воспаление слизистой оболочки описывали как DLT при 60 мг и

эту дозу расценивали как NTD; MTD определяли как равную 45 мг один раз в сутки, и она являлась дозой, которую принимали в дальнейшем в части В (см. фиг. 22).

Наиболее часто встречающиеся связанные с соединением 1 события (>20%), а также все связанные со степенью 3/4 события представлены на фиг. 22. Усталость, токсичность GI (включая воспаление слизистой оболочки/стоматит), гипергликемия, сыпь и артралгия представляли собой наиболее часто встречающиеся события. Возникал один случай интерстициального пневмонита 3 степени, требующий госпитализации. Дозирование соединения 1 сохраняли, и пневмонит поддавался лечению стероидами. Максимальная переносимая доза (MTD) составляла 45 мг один раз в сутки. (см. фиг. 23).

Наиболее часто описывали гипергликемию с началом, как правило, приходившимся на время 1 цикла. Гипергликемия была ассоциирована с повышением инсулина и с-пептида (фиг. 24) и являлась дозозависимой. В начале испытания проводили ежесуточный мониторинг уровня глюкозы при взятии крови из пальца с быстрым введением метформина и/или инсулина при первом возникновении гипергликемии. Гипергликемия, как правило, поддавалась лечению, и пациенты были способны продолжать лечение соединением 1 при аналогичной или сниженной дозе.

Наблюдала пропорциональную дозу концентрацию лекарственного средства, хотя существовал очень высокий уровень вариабельности концентрации между индивидуумами. При уровнях дозирования 30 мг и выше на основании доклинических моделей ксенотрансплантатов предполагают, что концентрации, превышающие уровни, обеспечивают >50% ингибирование сигнальных путей TORC1 (фосфо-S6) и TORC2 (фосфо-AKT) по меньшей мере в течение 8 ч после дозирования. Наблюдала только минимальное накопление лекарственного средства через 15 суток после дозирования. Наблюдала дозозависимую концентрацию с конечным периодом полувыведения от 4 до 8 ч (средняя равновесная C_{max} 485 нг/мл, AUC_{0-24} 2371 нг×ч/мл при 45 мг) (см. фиг. 25).

В образцах крови наблюдали ингибирование биомаркеров сигнального пути TOR с использованием стимуляционного анализа (фиг. 26). Ингибирование TORC1 наблюдали посредством измерения изменений фосфо-4EBP1 и фосфо-S6 и TORC2 фосфо-Akt. Данные получали после первого дозирования соединения 1, и моменты времени получения образцов представляли собой перед дозированием, 1,5, 3 и 5 ч после дозирования. Ингибирование биомаркеров наблюдали в В-клетках, Т-клетках, и моноцитах и для демонстрации выбирали тип клеток с наиболее последовательными результатами. Соответствующее ингибирование обоих биомаркеров TORC1 и TORC2 наблюдали до 5 ч после дозирования соединения 1 в дозах 30 мг и выше, т.к. теоретически рассчитано на основании доклинического моделирования и получаемых концентраций у человека. Как правило, ингибирование маркера TORC1, фосфо-S6 являлось более полным и продолжительным, чем у маркера фосфо-4EBP1. Ингибирование фосфо-Akt подтверждало активность соединения 1, направленную против сигнальных путей TORC2, и отличает это средство от рапалогов, которые представляют собой преимущественно ингибиторы TORC1, и для которых было продемонстрировано, что они инициируют обратную положительную регуляцию фосфо-Akt. Анализ PK/PD продемонстрировал дозозависимую взаимосвязь концентрации соединения 1 и ингибирования mTOR-киназы.

У пятнадцати индивидуумов демонстрировали ответы целевых очагов в стабильном диапазоне (см. фиг. 28), где для 1 индивидуума с раком молочной железы выявляли более чем 30% регрессию целевых очагов (см. фиг. 27). 2 индивидуума с наибольшей регрессией опухоли страдали ER+раком молочной железы. Для одного индивидуума с раком молочной железы проводили более 11 циклов исследуемого лечения и демонстрировали подтвержденную PR, тогда как для второго индивидуума с ER+раком молочной железы проводили приблизительно 6 циклов исследуемого лечения и демонстрировали SD во время сканирования при первом повторном определении стадии (после 2 циклов лечения).

Уровень дозирования, продолжительность лечения и лучший общий ответ представлен на фиг. 29. Для одного индивидуума с раком молочной железы демонстрировали полную PR и проводили более 11 циклов исследуемого лечения. Для индивидуума проводили повышение дозы от 30 до 45 мг. Восемь индивидуумов имели стабильное заболевание во время сканирования при первом повторном определении их стадии (после 2 циклов лечения). Наибольшая продолжительность SD составляла 24 недели. Опухоли с SD включали NSCLC (2), молочной железы, рак слюнных желез, рак поджелудочной железы, аденокарциномный рак, злокачественные опухоли надпочечников и колоректальный рак (CRC). SD наблюдали при дозах в диапазоне от 15 до 60 мг.

У индивидуума с ER+/Her2-раком молочной железы, у которого получали частичный ответ (см. фиг. 27) после по меньшей мере 11 месяцев и проведения более 11 циклов исследуемого лечения, демонстрировали 30% уменьшение целевых очагов при первом повторном определении стадии после 2 циклов терапии, демонстрировали дальнейшую регрессию в каждый момент времени последующего повторного определения стадия при максимальном 50% уменьшении после 10 циклов терапии, а затем его исключали из исследования вследствие манифестации клинического прогрессирования в результате усугубления легочных симптомов во время 12-ого цикла. Продолжительность частичного ответа от первого сканирования при повторном определении стадии до последнего сканирования составляла 220 суток (7,2 месяцев или 7,9 циклов), и продолжительность частичного ответа от первого сканирования при повторном определении стадии до последнего дозирования составляла 271 суток (8,9 месяцев или 9,7 циклов). Период

времени до прогрессирования от первой дозы до последнего сканирования составлял 277 суток (9,1 месяцев или 9,9 циклов), и период времени до прогрессирования от первой дозы до последней дозы составляло 328 суток (10,8 месяцев или 11,7 циклов).

Соединение 1 являлось хорошо переносимым с токсичностями, сравнимыми с другими лекарственными средствами, направленными на эти сигнальные пути. Наблюдали проявления ингибирования сигнальных путей TORC1/TORC2, а также предварительные признаки противоопухолевой активности, включая частичный ответ и стабильное заболевание, описанные выше. Увеличение когорт в выбранных гематологических и солидных опухолях обеспечивает оценку соединения 1 при MTD 45 мг один раз в сутки.

Часть В. Результаты повышения дозы (на основании результатов от 20 сентября, 2012 года).

Ингибирование биомаркеров сигнального пути TOR: Во всех когортах наблюдали ингибирование TORC1 и TORC2 в крови, как измерено по ингибированию образования фосфо-Akt и фосфо-4EPB1 при измерении на исходном уровне (среднее значение скрининга и цикла 1/сутки 1 (t=0 ч) и на цикле 1/сутки 1 (t=1,5 ч после дозирования) и в цикле 1/сутки 15 (t=0 ч и 1,5 ч). Данные анализировали посредством парного t-критерия и получали значение $P < 0,001$ при сравнении исходного уровня и цикла 1/сутки 1 (t=1,5 ч после дозирования) и между циклом 1/сутки 15 (t=0 ч) и циклом 1/сутки 15 (t=1,5 ч). Пациенты с NSCLC: у большинства пациентов наблюдали ингибирование TORC1 (как измерено по проценту изменения от исходного уровня для p4EPB1) и ингибирование TORC2 (как измерено по проценту изменения от исходного уровня для фосфо-Akt/tAkt). У пациентов с NSCLC наблюдали ясные признаки клинической активности. У 17 оцениваемых пациентов наблюдали наибольшие ответы целевых очагов до 35% уменьшения, где 11 пациентов соответствовали по меньшей мере стабильному заболеванию и 1 пациент соответствовал критериям частичного ответа RECIST 1.1. Для четырех пациентов проводили по меньшей мере 6 циклов исследуемого лечения, и один пациент остается на исследуемом лекарственном средстве после 11 циклов.

Пациенты с раком молочной железы: в фазе оптимизации пять индивидуумов начали прием исследуемого лекарственного средства. Собирают информацию о биомаркерах и ответе.

Процитирован ряд ссылочных документов, описания которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Предполагают, что описываемые в настоящем описании варианты осуществления не ограничены в объеме конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в примерах, которые служат в качестве иллюстраций некоторых аспектов раскрытых вариантов осуществления, и в объем настоящего изобретения входят любые варианты осуществления, которые являются функционально эквивалентными. Фактически, различные модификации вариантов осуществления, описываемых в настоящем описании в дополнение к демонстрируемым и описываемым в настоящем описании вариантам осуществления, будут понятны специалистам в данной области, и предполагают, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

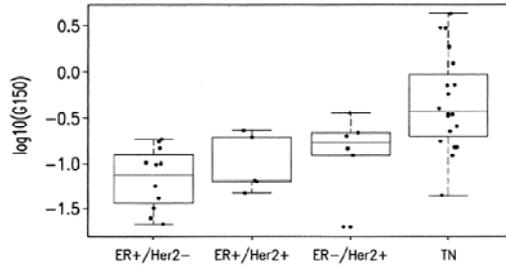
1. Способ лечения солидной опухоли, включающий введение эффективного количества 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пипразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера пациенту, страдающему солидной опухолью, где солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких или рак молочной железы и где солидная опухоль является устойчивой к рапамицину.

2. Способ по п.1, где солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.

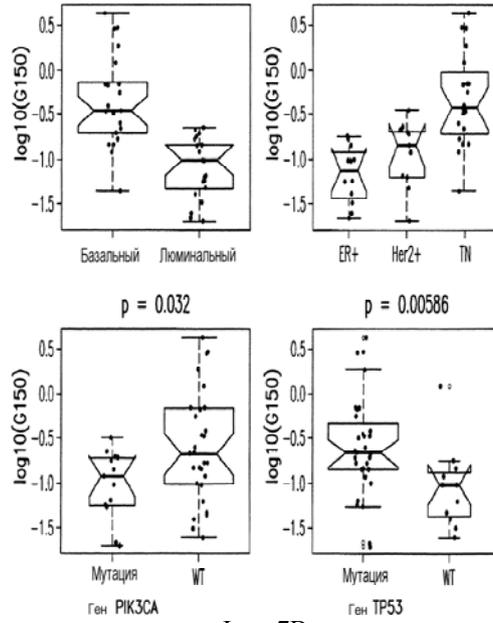
3. Способ по п.2, где рак молочной железы является ER+/Her2-, ER+/Her2+, ER-/Her2+ или тройным негативным (TN).

4. Способ по п.1, где солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких.

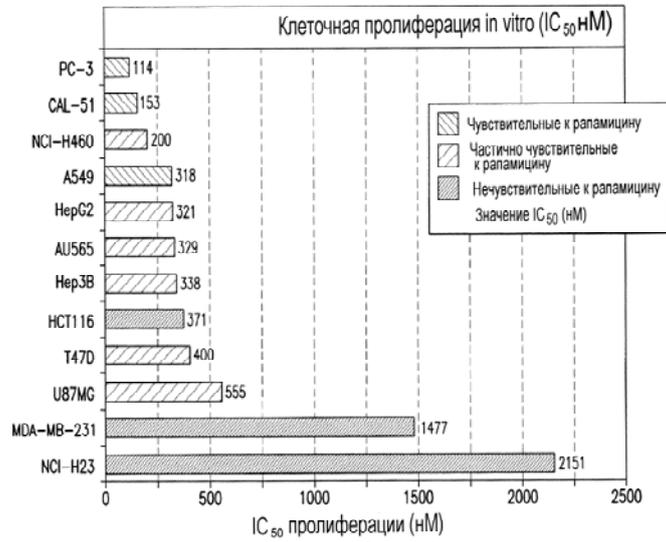
5. Способ получения полного ответа, частичного ответа или стабильного заболевания, как определено критериями оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1), у пациента, включающий введение эффективного количества 7-(6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-3-ил)-1-(транс-4-метоксициклогексил)-3,4-дигидропиразино[2,3-b]пипразин-2(1H)-она или его фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера пациенту, страдающему солидной опухолью, где солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легких или рак молочной железы, и где солидная опухоль является устойчивой к рапамицину.



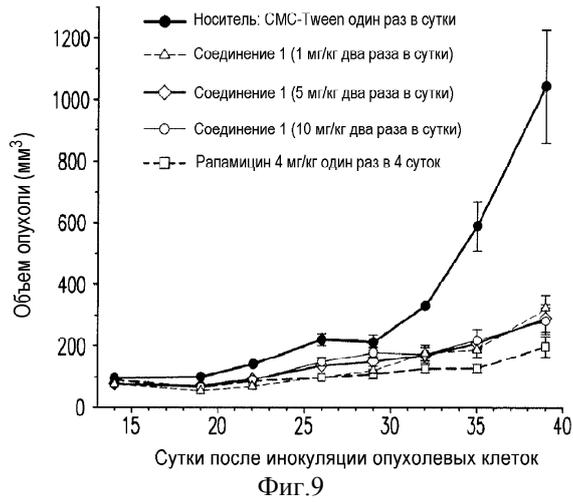
Фиг. 7А



Фиг. 7В



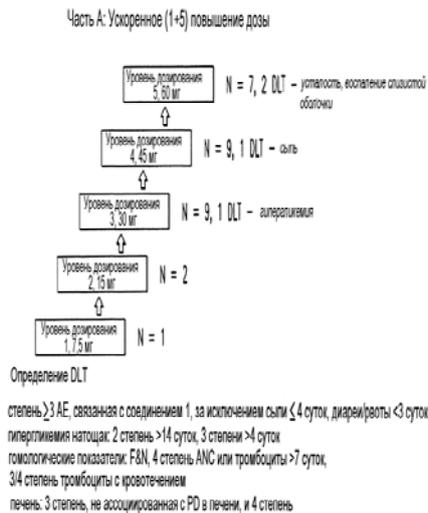
Фиг. 8



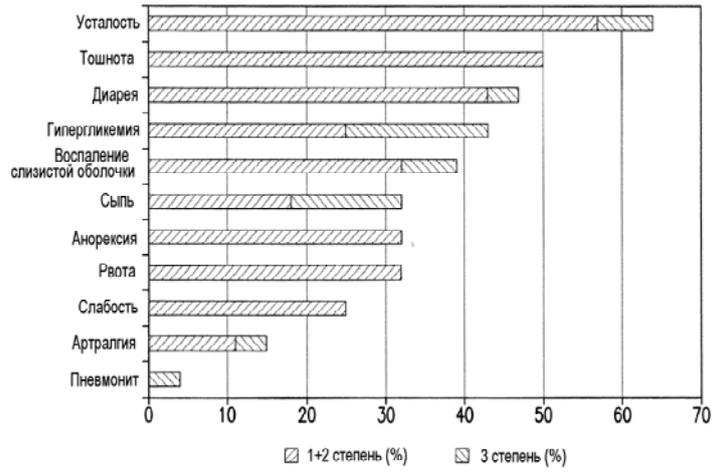
Фиг. 9

Средний возраст (диапазон)	50	25–80
Пол (n, %)		
М	9	32
Ж	19	68
ECOG (n, %)		
0	16	57
1	11	39
2	1	4
Тип опухоли (n, %)		
CRC	6	21
рак молочных желез	3	11
рак поджелудочной железы	3	11
NSCLC	2	7
GBM	2	7
HCC	2	7
рак слюнных желез	2	7
Другие* (каждый 1)	8	29
Число получаемых ранее видов терапии (n, %)		
1–3	14	50
>3	14	50

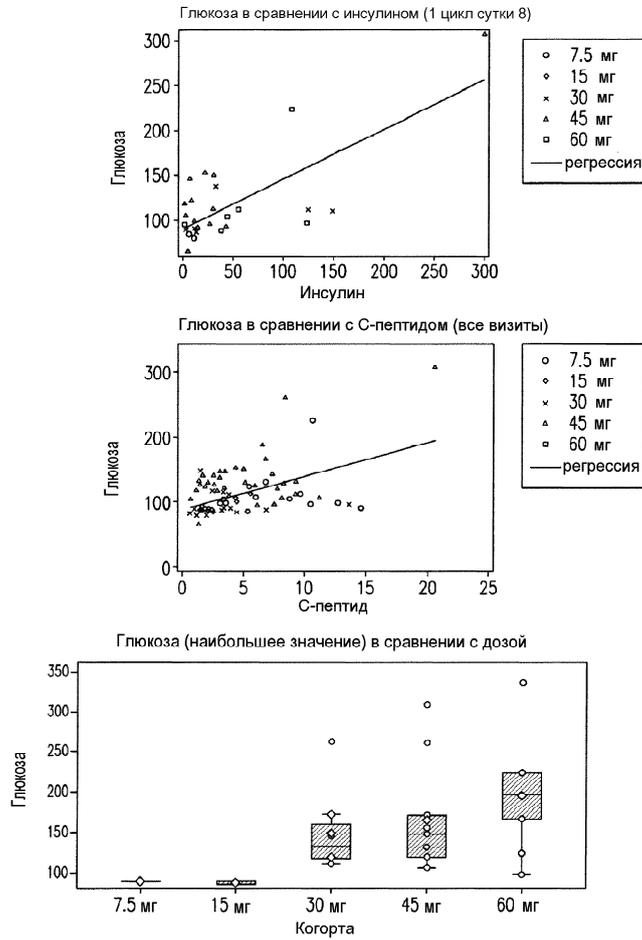
Фиг. 21



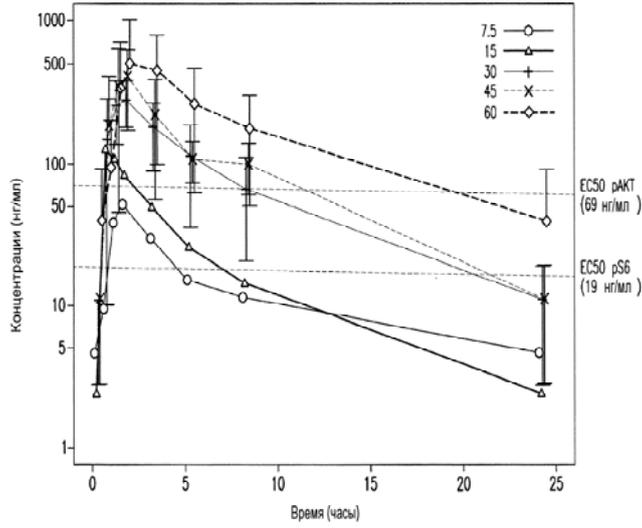
Фиг. 22



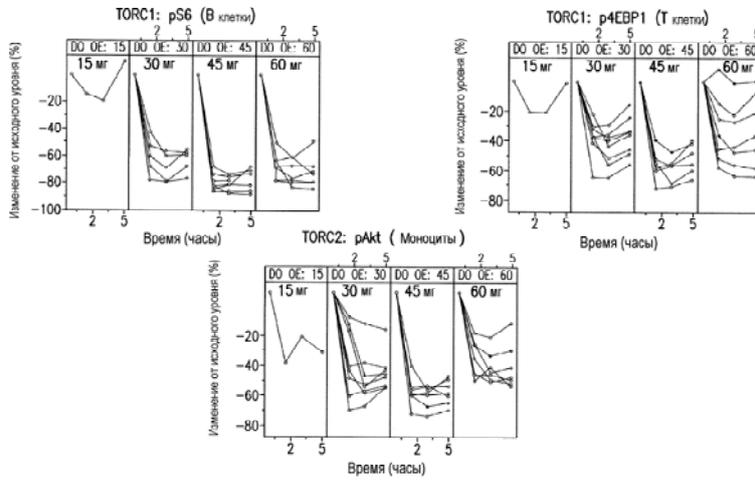
Фиг. 23



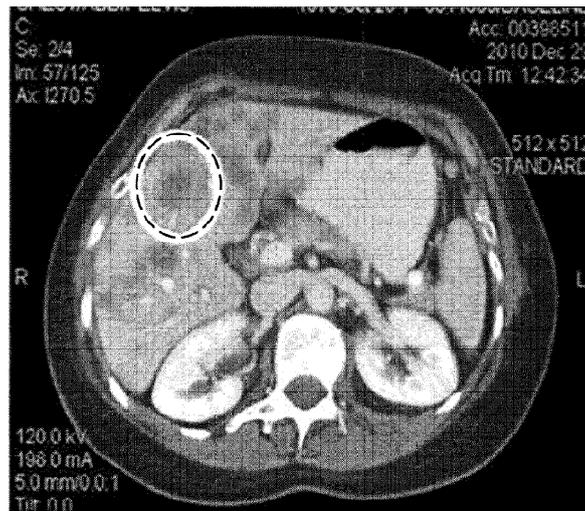
Фиг. 24



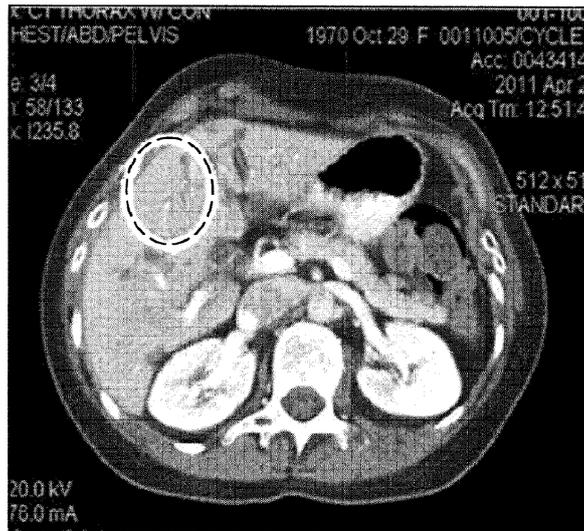
Фиг. 25



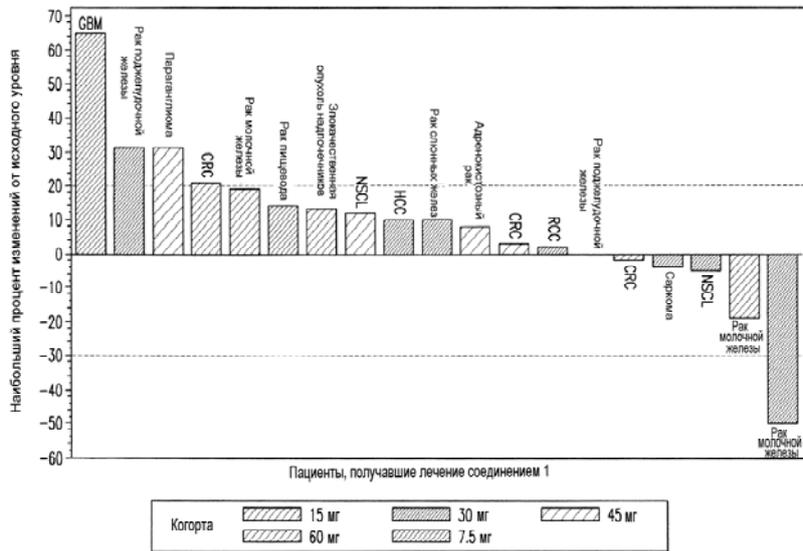
Фиг. 26



Фиг. 27А



Фиг. 27В



Фиг. 28

Циклы лечения	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	CB-C12
7.5 мг	1-001	Пак пищевода	PD					
15 мг	1-002	Рак молочной железы					SD	
15 мг	1-007	GBM	PD					
30 мг	1-003	NSCLC	SD					
30 мг	2-002	Рак поджелудочной железы	PD (гипергликемия DLT)					
30 мг	1-004	Рак почки	PD					
30-45 мг	1-005	Рак молочной железы						PR
30 мг	2-004	Лейомиосаркома	PD					
30 мг	1-006	HCC	NE					
30 мг	1-010	HCC	PD					
30/45 мг	1-008	Рак слюнных желез					SD	
45 мг	2-005	CRC	PD					
45 мг	2-006	Парагангиома	PD					
45 мг	1-009	Нейроэндокринная опухоль	PD					
45 мг	2-007	Рак поджелудочной железы					SD (DLT сыпь)	
45 мг	2-008	MM	NE					
45 мг	1-012	NSCLC					SD	
45 мг	2-009	CRC	NE					
45 мг	2-015	Аденокарцинома	SD					
45 мг	2-016	GBM	NE					
60/45 мг	2-010	CRC	PD (DLT усталость)					
60 мг	2-011	CRC	NE					
60/45 мг	1-013	CRC	NE					
60 мг	1-014	Злокачественная опухоль надпочечников	PD					
60/30 мг	1-017	Рак молочной железы	PD (DLT воспаление слизистых оболочек)					
60/45 мг	2-013	Злокачественная опухоль надпочечников					SD	
60 мг	2-014	CRC	SD					

*Пациент 2-01 исключали (нарушение протокола после одной дозы)

Фиг. 29



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2