

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391949** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.25**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.01.17**

(51) Int. Cl. *A61K 31/4704* (2006.01)  
*A61K 35/00* (2006.01)  
*A61N 5/00* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

---

(54) **ТАСКВИНИМОД ИЛИ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМАЯ СОЛЬ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

---

(31) **21152018.4; 21201509.3; 21205665.9**

(32) **2021.01.18; 2021.10.07; 2021.10.29**

(33) **EP**

(86) **PST/EP2022/050891**

(87) **WO 2022/152902 2022.07.21**

(71) Заявитель:

**ЭКТИВ БАЙОТЕК АБ (SE)**

(72) Изобретатель:

**Вобус Манья, Зокель Катя,  
Борнхойзер Мартин (DE)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении миелодиспластического синдрома (MDS).

---

**A1**

**202391949**

**202391949**

**A1**

## ТАСКВИНИМОД ИЛИ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМАЯ СОЛЬ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новому применению производного хинолина тасквинимода. Более конкретно, изобретение относится к тасквинимоду или его фармацевтически приемлемой соли для применения при лечении миелодиспластического синдрома.

### Предпосылки создания изобретения

Тасквинимод и способ его получения описаны в международных заявках № PCT/SE99/00676, опубликованной как WO 99/55678, и № PCT/SE99/01270, опубликованной как WO 00/03991, в которых также раскрыта применимость тасквинимода и некоторых других хинолинкарбоксамидов для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, инсулинозависимый сахарный диабет, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника и псориаз, а также заболеваний, при которых патологическое воспаление играет важную роль, таких как астма, атеросклероз, инсульт и болезнь Альцгеймера.

Способы, используемые для получения тасквинимода, также раскрыты в международной заявке № PCT/SE2003/000780, опубликованной как WO 03/106424, и международной заявке № PCT/EP2011/061490, опубликованной как WO 2012/004338. Дейтерированная форма тасквинимода была описана в международной заявке № PCT/EP2012/061798, опубликованной как WO 2012/175541.

Применение различных хинолинкарбоксамидов для лечения рака, более конкретно солидных раков, таких как рак простаты и рак молочной железы, раскрыто в международной заявке № PCT/SE00/02055, опубликованной как WO 01/30758. Установлено, что некоторые из этих соединений связываются и ингибируют взаимодействия иммуномодулирующего белка (S100A9), который способствует развитию опухоли, влияет на супрессорные и проангиогенные клетки в микроокружении опухоли и участвует в создании преметастатических ниш.

В международной заявке № PCT/EP2015/075769, опубликованной как WO 2016/078921, раскрывается тасквинимод для применения при лечении лейкоза, включая острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и хронический миелоидный лейкоз.

В международной заявке № PCT/EP2015/071391, опубликованной как WO 2016/042112, раскрывается тасквинимод для применения при лечении множественной

миеломы.

В международной заявке № PCT/EP2016/053288, опубликованной как WO 2016/146329, раскрывается тасквинимод для применения совместно с ингибитором PD-1 и (или) PD-L1 при лечении рака, в частности рака мочевого пузыря.

Миелодиспластические синдромы (MDS) представляют собой гетерогенный спектр хронических миелоидных неоплазий или клональных нарушений гемопоэтических стволовых клеток, связанных с неэффективным гемопоэзом, который проявляется как симптоматическая цитопения, морфологическая дисплазия, а также со значительным риском прогрессирования острого миелоидного лейкоза.

MDS являются одним из наиболее распространенных гематологических новообразований у пожилого населения с медианой возраста 65-70 лет; однако заболевание может возникнуть в любом возрасте. Хотя для первичного MDS отсутствует явный фактор риска, хорошо известным фактором риска вторичного MDS является повреждение ДНК предшествующей химио- или лучевой терапией. Кроме того, MDS у детей может быть вторичным по отношению к наследственной недостаточности костного мозга (например, анемии Фанкони или врожденному дисцератозу).

Пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников и их дифференциацию в зрелые клетки крови регулируют многочисленные биологические процессы. Молекулярные изменения в гемопоэтических стволовых клетках, нарушающие любой из этих процессов, являются неотъемлемой частью патогенеза MDS. Около 80-90% пациентов с MDS имеют соматические мутации в гемопоэтических стволовых клетках. Тип и частота соматических мутаций вносят вклад в дисфункцию сигнальных путей при MDS и связаны с прогнозом заболевания и реакцией на определенные лекарства. Помимо молекулярных изменений гемопоэтических стволовых клеток, центральную роль в патогенезе MDS играет окружающая ниша костного мозга. Аберрантная передача сигналов воспаления, включая активацию инфламмосомы NLRP3, может способствовать селекции, поддержанию и лейкемической эволюции злокачественного клона MDS.

Пациенты с MDS могут быть бессимптомными при постановке диагноза, однако до 80% имеют анемию. Пациенты в первую очередь страдают от симптомов, связанных с цитопенией, таких как утомляемость и слабость из-за анемии, инфекции, связанные с нейтропенией, или кровотечения из-за тромбоцитопении. Примерно у 1/3 пациентов с MDS развивается острый миелоидный лейкоз.

Пересмотренная Международная прогностическая система оценки MDS (IPSS-R) является наиболее широко используемой прогностической системой для определения прогноза заболевания. Модель демонстрирует 5 категорий риска в зависимости от степени

цитопении, процента бластов костного мозга и цитогенетической подгруппы.

Несмотря на то, что MDS является одним из наиболее распространенных гематологических новообразований у пожилых людей, доступно лишь небольшое число вариантов лечения. Помимо поддерживающей терапии, в Европе одобрены только пять препаратов (эритропоэтин, луспATERCEPT, хелатор железа деферазирокс, иммуномодулирующий препарат леналидомид и гипометилирующий агент азацитидин). Единственным видом терапии, направленной на излечение, является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, которая, однако, невозможна у многих пожилых пациентов.

Поддерживающая терапия включает трансфузионную терапию, лечение препаратами, стимулирующими эритропоэз, и лечение антибиотиками. Трансфузионная терапия (переливание крови) представляет собой способ введения эритроцитов, лейкоцитов или тромбоцитов для замены клеток крови, разрушенных болезнью или лечением. Частые переливания эритроцитарной массы приводят к перегрузке железом и сопутствующей органной токсичности с неблагоприятным клиническим исходом. Направленная на связывание железа в хелатные комплексы терапия деферазироксом может улучшить исход для пациента. Препараты, стимулирующие эритропоэз (ESA), назначаются для увеличения количества зрелых эритроцитов, вырабатываемых организмом, и для уменьшения последствий анемии. Иногда вместе с ESA назначают гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), чтобы повысить эффективность лечения. Наконец, антибиотикотерапия может использоваться для борьбы с инфекцией.

Медикаментозная терапия включает лечение, например, леналидомидом, который одобрен только для пациентов с миелодиспластическим синдромом, связанным с изолированной хромосомной аномалией del(5q), которым требуются частые переливания эритроцитарной массы. У пациентов с трансфузионно-зависимым MDS с кольцевыми сидеробластами, рефрактерным или маловероятным ответом на ESA можно использовать луспATERCEPT. Гипометилирующий агент азацитидин можно использовать для лечения миелодиспластического синдрома на поздних стадиях заболевания, чтобы замедлить прогрессирование миелодиспластического синдрома до острого миелоидного лейкоза. Обычно классическая химиотерапия используется только перед трансплантацией стволовых клеток у пациентов с повышенным количеством бластов для уменьшения нагрузки опухолевыми клетками.

Во время аллогенной трансплантации стволовых клеток эти клетки (незрелые клетки крови) берут из крови или костного мозга здорового донора и переливают

больному MDS после завершения подготовительной терапии. Донорские гемопоэтические стволовые клетки заменяют исходный костный мозг пациента и восстанавливают клетки крови в организме (так называемое приживление).

Краткое описание сущности изобретения

Первый аспект представляет собой тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль для применения при лечении миелодиспластического синдрома.

Дополнительный аспект представляет собой применение тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения миелодиспластического синдрома.

Еще один дополнительный аспект представляет собой фармацевтический состав, содержащий терапевтически эффективное количество тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли, для лечения миелодиспластического синдрома.

Дополнительный аспект представляет собой способ лечения миелодиспластического синдрома у нуждающегося в таком лечении млекопитающего путем введения млекопитающему терапевтически эффективного количества тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительные аспекты и их воплощения станут очевидными из следующего описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, на котором показана концентрация S100A9 (в пг/мл) в костном мозге, полученном от здоровых пациентов (контроль) и пациентов с низким риском MDS (LR-MDS) и высоким риском MDS (HR-MDS), соответственно.

На фиг. 2 показаны вестерн-блоты фосфорилированного IRAK1 (80 кДа), NF- $\kappa$ B-p65 (65 кДа) и гасдермина (50 кДа) в MSCs (мезенхимальные стволовые клетки) при MDS (MDS MSCs) после обработки S100A9 или S100A9 и тасквинимодом в течение 48 часов. GAPDH (38 кДа) использовали в качестве эталонного белка. Дорожка 1 = необработанный контроль; дорожка 2 = обработка S100A9; дорожка 3 = обработка S100A9/тасквинимодом.

Фиг. 3 представляет собой гистограмму, представляющую уровни экспрессии мРНК IL-1 $\beta$ , IL-18, Casp1 и PD-L1, определенные с помощью ПЦР в реальном времени, в MDS MSCs после 48-часовой обработки только тасквинимодом (TASQ), только S100A9 (S100A9) или S100A9 и тасквинимодом совместно (S100A9+TASQ). Ампликоны для IL-1 $\beta$ , IL-18, Casp1 и PD-L1 нормировали по эндогенной экспрессии GAPDH, а необработанные MSCs устанавливали на 1 (=контроль).

На фиг. 4 показан вестерн-блоттинг PD-L1 в здоровых MSCs и MSCs при CMML (хронический миеломоноцитарный лейкоз) (CMML MSCs) после обработки S100A9 и

тасквинимодом в течение 48 часов. Дорожка 1 = необработанный контроль; дорожка 2 = обработка тасквинимодом; дорожка 3 = обработка S100A9; дорожка 3 = обработка S100A9 и тасквинимодом.

На фиг. 5 показан вестерн-блоттинг фосфорилированного IRAK1 (80 кДа), NF- $\kappa$ B-p65 (65 кДа) и гасдермина (50 кДа) в MDS MSCs после обработки TNF- $\alpha$  и тасквинимодом в течение 48 часов. GAPDH (38 кДа) является эталонным белком. Дорожка 1 = обработка TNF- $\alpha$ ; дорожка 2 = обработка TNF- $\alpha$  и тасквинимодом

Фиг. 6а представляет собой гистограмму, демонстрирующую количественную оценку CAF-C при совместном культивировании MDS MSCs с гемопоэтическими клетками-предшественниками через одну, две, три и четыре недели без S100A9 или тасквинимода («без»), в присутствии тасквинимода (TASQ), в присутствии S100A9 (S100A9) и в присутствии как S100A9, так и тасквинимода (S100A9+TASQ).

Фиг. 6б представляет собой гистограмму, демонстрирующую количество колоний/300 клеток в анализах CFU, проведенных с использованием MDS MSCs, совместно культивируемых с гемопоэтическими клетками-предшественниками, собранными через одну неделю совместного культивирования в присутствии S100A9 или в присутствии как S100A9, так и тасквинимода, или в отсутствие как S100A9, так и тасквинимода («контроль»), при этом 300 клеток высевали в обогащенную метилцеллюлозой среду с рекомбинантными цитокинами (MethoCult™ H4435, STEMCELL Technologies). Колонии подсчитывали через 2 недели и классифицировали под микроскопом или с помощью системы STEMvision™ (STEMCELL Technologies).

Фиг. 6с представляет собой гистограмму, демонстрирующую количество колоний/300 клеток в анализах CFU, проведенных с использованием клеток MDS MSCs и гемопоэтических клеток-предшественников, собранных через одну неделю совместного культивирования в присутствии («TASQ») или в отсутствие («без») тасквинимода, при этом 300 клеток высевали в обогащенную метилцеллюлозу среду с рекомбинантными цитокинами (MethoCult™ H4435, STEMCELL Technologies). Колонии подсчитывали через 2 недели и классифицировали под микроскопом или с помощью системы STEMvision™ (STEMCELL Technologies).

#### Подробное описание

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области, к которой относится данное изобретение.

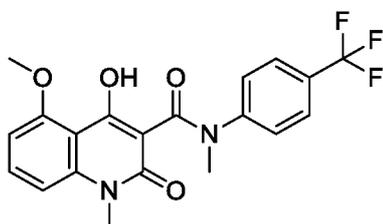
Аббревиатуры и акронимы, используемые в настоящем описании, считаются хорошо известными специалистам в данной области, но для ясности значение некоторых

из них указано ниже:

ALP	щелочная фосфатаза
$\alpha$ SMA	альфа-гладкомышечный актин
BCA	анализ на бицинхониновую кислоту
BFU-E	эритроидная бурсто-образующая единица
BM	костный мозг
CAF-C	клетки, формирующие зону «бульжной мостовой»
cDNA	комплементарная ДНК
CFU	колониеобразующая единица
CFU-E	эритроидная колониеобразующая единица
CFU-GEMM	гранулоцитарная, эритроцитарная, моноцитарная, мегакариоцитарная колониеобразующая единица
CFU-GM	гранулоцитарно/макрофагальная колониеобразующая единица
CMML	хронический миеломоноцитарный лейкоз
Cy	цианин
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол
DMEM	Среда Игла, модифицированная Дульбекко
dT	дезокситимидин
ECAR	скорость внеклеточного подкисления
ECL	усиленная хемилюминесценция
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
ELISA	твердофазный иммуноферментный анализ
FCCP	карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон
FCS	фетальная телячья сыворотка
FLT3-L	лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3
GAPDH	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
HRP	пероксидаза хрена
HSA	сывороточный альбумин человека
HSC(s)	гемопозитическая стволовая клетка (клетки)
IgG	иммуноглобулин G
IL	интерлейкин
IRAK1	Киназа 1, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1
MDS	миелодиспластический синдром
MDS-RS	миелодиспластический синдром с кольцевыми сидеробластами
MSC(s)	мезенхимальная стволовая клетка (клетки)

NF-κB	усилитель каппа легкой цепи ядерного фактора активированных В-клеток
OCR	скорость потребления кислорода
PBMC	Моноядерная клетка периферической крови
PBS	фосфатно-солевой буфер
PD-1	белок 1 программируемой гибели клеток
PD-L1	лиганд белка 1 программируемой гибели клеток
RIPA	анализ радиоиммунопреципитации
RNA	рибонуклеиновая кислота
ROS	активные формы кислорода
ROX	карбокси-X-родамин
RT-PCR	полимеразная цепная реакция в реальном времени
SCF	фактор стволовых клеток
SDS	додецилсульфат натрия
TLR4	toll-подобный рецептор 4
TNF-α	фактор некроза опухоли альфа

Соединение тасквинимод, или 4-гидрокси-5-метокси-N,1-диметил-2-оксо-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамид, имеет структурную формулу



«Необязательный» или «необязательно» означает, что описываемое впоследствии событие или обстоятельство может произойти, но не обязательно происходит, и что настоящее описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

«Фармацевтически приемлемый» означает то, что полезно при приготовлении фармацевтической композиции, и в целом безопасно, нетоксично и не является нежелательным ни с биологической, ни с иной точек зрения, и включает все, что приемлемо для ветеринарного применения, а также для медицинского фармацевтического применения по отношению к человеку.

Примеры фармацевтически приемлемых солей содержат соли с (в качестве противоиона) ионом щелочного металла, например Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> или K<sup>+</sup>, или соли с ионом щелочноземельного металла, например Mg<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup>, или соли с любым другим

фармацевтически приемлемым ионом металла, например  $Zn^{2+}$  или  $Al^{3+}$ ; или фармацевтически приемлемые соли, образованные с органическими основаниями, такими как диэтаноламин, этаноламин, N-метилглюкамин, триэтаноламин или трометамин

«Терапевтически эффективное количество» означает количество тасквинимода или его фармацевтической соли, которое при введении субъекту для лечения заболевания (в данном случае MDS) является достаточным для осуществления такого лечения. «Терапевтически эффективное количество» варьирует в зависимости, например, от возраста и относительного здоровья субъекта, подлежащего лечению, степени прогрессирования заболевания, способа и формы введения, возможного дополнительного использования других лекарственных средств, например в составе комбинированной терапии и др. В соответствии с некоторыми воплощениями «эффективное количество» обеспечивает лечебный эффект (например, лечит, предотвращает, ингибирует, облегчает, стимулирует, улучшает, увеличивает, уменьшает и т.д.), определяемый как статистически значимое изменение одного или нескольких показаний, симптомов, признаков, результатов диагностических тестов, основных показателей жизнедеятельности и т.д. В соответствии с дополнительными воплощениями «эффективное количество» подавляет, контролирует или предотвращает заболевание, что определяется как отсутствие статистически значимого изменения одного или нескольких показаний, симптомов, признаков, диагностических тестов, основных показателей жизнедеятельности и т.д.

Используемые здесь термины «лечение» или «обработка» определяют подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Полезные или желаемые клинические результаты могут включать, но не ограничиваются указанным, облегчение или улучшение одного или нескольких симптомов заболевания, подлежащего лечению, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, предотвращение распространения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение заболевания и ремиссию (частичную или полную), поддающуюся обнаружению или неопределяемую. Эти термины также могут означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без лечения.

Пациенты с MDS в первую очередь страдают от цитопении, такой как анемия, тромбоцитопения, нейтропения, бицитопения и панцитопения, и связанных с ней симптомов, таких как утомляемость, анемия, слабость, легкие кровоподтеки или кровотечения, лихорадка, боль в костях, одышка и частые инфекции.

Термин «млекопитающее» относится к человеку или любому животному-млекопитающему, например примату, сельскохозяйственному животному, домашнему

животному или лабораторному животному. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека

Субъект-млекопитающее (например, человек), которого можно надлежащим образом лечить в соответствии с настоящим изобретением, может болеть MDS или быть подверженным (повышенному) риску развития MDS.

Используемый здесь термин «MDS» относится к группе приобретенных нарушений кроветворения, характеризующихся периферической цитопенией и нормоцеллюлярным или гиперклеточным костным мозгом. Подтипы MDS включают MDS с однолинейной (монолинейной) дисплазией, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS, ассоциированный с изолированной хромосомной аномалией del, такой как MDS с изолированной del(5q), MDS с избытком бластов и MDS, не поддающиеся классификации.

ВОЗ классифицировала формы MDS на различные подтипы в зависимости от таких критериев, как процент миелобластов в костном мозге, наличие аномальных предшественников эритроцитов (кольцевых сидеробластов) в костном мозге, количество в костном мозге аномальных типов клеток, называемых диспластическими линиями, и генетический профиль клеток костного мозга, как показано ниже:

MDS с однолинейной дисплазией (MDS-SLD) – цитопения крови 1 или 2; в костном мозге дисплазия  $\geq 10\%$  клеток в одной клеточной линии,  $< 5\%$  бластов.

MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD) – цитопения крови 1–3,  $< 1 \times 10^9/\text{л}$  моноцитов; в костном мозге дисплазия  $\geq 10\%$  клеток в  $\geq 2$  гемопозитических линиях,  $< 15\%$  кольцевых сидеробластов (или  $< 5\%$  кольцевых сидеробластов при наличии мутации SF3B1),  $< 5\%$  бластов.

MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS) – анемия, бластов нет; в костном мозге  $\geq 15\%$  эритроидных предшественников с кольцевыми сидеробластами или  $\geq 5\%$  кольцевых сидеробластов при наличии мутации SF3B1

MDS с изолированной del(5q) – анемия, тромбоциты в норме или снижены; в костном мозге однолинейная эритроидная дисплазия, изолированная del(5q),  $< 5\%$  бластов  $\pm$  еще одна аномалия, кроме -7/del(7q)

MDS с избытком бластов (MDS-EB) - цитопения крови 1-3, 0-3 диспластических линий костного мозга и 5-9% бластов в костном мозге или 2-4% бластов в крови (MDS-EB1) или 10-19 % бластов в костном мозге или 5-19% бластов в крови (MDS-EB2)

MDS, не поддающийся классификации, – цитопения  $\pm 1\%$  бластов не менее чем в 2 случаях; в костном мозге однолинейная дисплазия или отсутствие дисплазии, но характерная цитогенетика MDS,  $< 5\%$  бластов.

Классификация ВОЗ также включает предварительную категорию рефрактерной детской цитопении, при цитопении и  $< 2\%$  бластов в периферической крови и в костном мозге, дисплазией в 1-3 линиях и  $< 5\%$  бластов.

Кроме того, согласно классификации ВОЗ, CMML (CMML-0, CMML-1, CMML-2) и MDS/MPN-RS-T являются классическими перекрестными синдромами MDS/MPN.

Классификация, разработанная ВОЗ, используется в настоящем описании для определения различных подтипов MDS, но, если иное не указано или не следует из контекста, термин MDS, используемый в настоящем описании, считается включающим любой подтип MDS, например, любой из указанных выше подтипов, в том числе CMML. Однако в соответствии с некоторыми воплощениями, MDS, более конкретно, представляет собой MDS с однолинейной дисплазией, как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой MDS с мультилинейной дисплазией (MDS-MLD), как определено выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой MDS с изолированным del(5q), как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой MDS с избытком бластов (MDS-EB), как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой неклассифицируемый MDS, как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, представляет собой детскую рефрактерную цитопению, как описано выше. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS, более конкретно, включает CMML. В соответствии с некоторыми дополнительными воплощениями MDS не включает CMML.

В дополнение к системе диагностической классификации, упомянутой выше, была разработана прогностическая система, называемая Пересмотренной международной прогностической системой оценки (IPSS-R), в соответствии с которой MDS можно отнести к категории очень низкого риска, низкого риска, промежуточного риска, высокого риска или очень высокого риска, см. руководство, опубликованное Greenberg, Tuechler, Schanz et al., Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R for Myelodysplastic Syndrome, Blood 120: 2454, 2012) и Schanz J et al, (J Clin Oncology 2012; 30:820). Система использует количество гемоглобина (г/дл), абсолютное количество нейтрофилов ( $\times 10^9/\text{л}$ ), тромбоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ), бласт костного мозга (в процентах) и цитогенетическую категорию MDS. Цитогенетическая категория определяется как очень хорошая, хорошая, промежуточная, плохая или очень плохая в зависимости от наличия определенных

цитогенетических нарушений, как показано в таблице 1.

Таблица 1

Цитогенетические прогностические подгруппы	Цитогенетические нарушения
Очень хорошая	-Y, del(11q)
Хорошая	Нормальная, del(5q), del(12p), del(20q), двойное включение del(5q)
Промежуточная	del(7q), +8, +19, i(17q), любые другие одинарные или двойные независимые клоны
Плохая	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), двойное включение -7/del(7q), Комплекс: 3 нарушения
Очень плохая	Комплекс: >3 нарушений

Цитогенетическая прогностическая подгруппа и определенное значение каждого из вышеперечисленных критериев (количество гемоглобина (г/дл), абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ( $\times 10^9/\text{л}$ ), тромбоциты ( $\times 10^9/\text{л}$ ), бласты костного мозга (проценты)) пациента оцениваются, как показано в таблице 2.

Таблица 2

Прогностическая переменная	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Цитогенетика	Очень хорошая		Хорошая		Промежуточная	Плохая	Очень плохая
Бласты костного мозга (%)	$\leq 2$		$>2 - <5\%$		5-10%	$>10\%$	
Гемоглобин (г/дл)	$\geq 10$		8- $<10$	$<8$			
Тромбоциты $\times 10^9/\text{L}$	$\geq 100$	50- $<100$	$<50$				
ANC $\times 10^9/\text{L}$	$\geq 0,8$	$<0,8$					

Полученная общая оценка риска используется для классификации MDS по категории прогностического риска IPSS-R, как показано в таблице 3.

Таблица 3

Категория риска	Показатель риска
Очень низкий	$\leq 1,5$
Низкий	$>1,5 - 3$
Промежуточный	$>3 - 4,5$
Высокий	$>4,5 - 6$
Очень высокий	$>6$

Наконец, основываясь на данных более 7000 пациентов, IPSS-R ассоциировала каждую категорию прогностического риска с медианой времени выживания в годах и медианой времени до 25% развития AML, как показано в таблице 4.

Таблица 4

Категория риска	Очень низкий	Низкий	Промежуточный	Высокий	Очень высокий
Выживаемость*	8,8 лет	5,3 лет	3,0 лет	1,6 лет	0,8 года
AML/25 %**	Не сообщается	10,8 лет	3,2 года	1,4 лет	0,7 года

\* медианы, \*\* медиана времени до 25 % развития AML

В соответствии с некоторыми воплощениями, MDS включает различные формы анемии, такие как рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с кольцевидными сидеробластами, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная анемия с избытком бластов в трансформации и хронический миеломоноцитарный лейкоз. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS исключает MDS, развившийся в лейкоз. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента нет лейкоза.

В соответствии с воплощениями, тасквинимод предназначен для применения при лечении MDS, который был классифицирован по шкале риска в соответствии с Пересмотренной международной прогностической системой оценки (IPSS-R) для миелодиспластических синдромов, как указано в настоящем описании.

Если в настоящем описании не указано иное, MDS может относиться к любой из указанных выше категорий риска, как определено с использованием вышеуказанной пересмотренной международной прогностической системы оценки (IPSS-R).

В соответствии с некоторыми воплощениями, MDS относится к категории риска, определяемой как очень низкий (показатель риска меньше или равен 1,5), низкий (показатель риска больше 1,5 и меньше или равен 3), или промежуточный (показатель риска больше 3 и меньше или равен 4,5). В соответствии с некоторыми из этих воплощений MDS относится к категории риска, определяемой как низкий или промежуточный уровень риска, например, как промежуточный. В соответствии с некоторыми дополнительными воплощениями MDS относится к категории риска, определяемой как очень низкий или низкий, например, как низкий. В соответствии с другими воплощениями MDS относится к категории риска, определяемой как очень низкий.

В соответствии с дополнительными воплощениями MDS относится к категории риска, определяемой как промежуточный, высокий (показатель риска больше 4,5 и меньше или равен 6) или очень высокий (показатель риска больше 6). В соответствии с некоторыми из этих воплощений MDS относится к категории риска, определяемой как промежуточный или высокий, например, как высокий. В соответствии с некоторыми дополнительными воплощениями MDS относится к категории риска, определяемой как высокий или очень высокий, например, как очень высокий.

Анемия является важной, если не сказать преобладающей, причиной заболеваемости и ухудшения качества жизни у пациентов с MDS, в частности, у пациентов с MDS более низкого риска (например, с MDS очень низкого риска, низкого риска или промежуточного риска). Таким образом, в соответствии с некоторыми воплощениями, тасквинимод используется для лечения анемии у пациентов с более

низким риском MDS. В соответствии с некоторыми воплощениями, тасквинимод используется для лечения анемии в связи с MDS. В соответствии с некоторыми воплощениями, тасквинимод используется при лечении MDS, ассоциированного с анемией как его симптомом. В соответствии с некоторыми воплощениями, анемия выбрана из рефрактерной анемии, рефрактерной анемии с кольцевидными сидеробластами, рефрактерной анемии с избытком бластов, рефрактерной анемии с избытком бластов в трансформации и хронического миеломоноцитарного лейкоза. В соответствии с некоторыми воплощениями, анемия является рефрактерной анемией. В соответствии с некоторыми воплощениями, анемия является рефрактерной анемией с кольцевидными сидеробластами. В соответствии с некоторыми воплощениями, анемия является рефрактерной анемией с избытком бластов. В соответствии с некоторыми воплощениями, анемия является рефрактерной анемией с избытком бластов в трансформации и хроническим миеломоноцитарным лейкозом.

В соответствии с некоторыми воплощениями, тасквинимод предназначен для применения при лечении MDS у пациента, для которого был определен по крайней мере один клинический параметр, выбранный из количества гемоглобина, абсолютного количества нейтрофилов, количества тромбоцитов, бластов костного мозга (в процентах) и цитогенетических аномалий.

Например, в соответствии с некоторыми воплощениями MDS принадлежит к цитогенетической прогностической подгруппе, обозначенной как «очень хорошая», как описано в таблице 1. В соответствии с другими воплощениями MDS принадлежит к цитогенетической прогностической подгруппе, обозначенной как «хорошая», как описано в таблице 1. В соответствии с другими воплощениями MDS принадлежит к цитогенетической прогностической подгруппе, обозначенной как «промежуточная», как описано в таблице 1. В соответствии с другими воплощениями MDS принадлежит к цитогенетической прогностической подгруппе, обозначенной как «плохая», как описано в таблице 1. В соответствии с другими воплощениями MDS принадлежит к цитогенетической прогностической подгруппе, обозначенной как «очень плохая», как описано в таблице 1.

В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество бластов костного мозга меньше 2%. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество бластов костного мозга больше или равно 2% и меньше 5%. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество бластов костного мозга больше или равно 5% и меньше 10%. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество бластов костного мозга больше 10%.

В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS уровень гемоглобина больше или равен 10 г/дл. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS уровень гемоглобина больше или равен 8 г/дл и меньше 10 г/дл. В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS уровень гемоглобина меньше 8 г/дл.

В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество тромбоцитов больше или равно  $100 \times 10^9/\text{л}$ . В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество тромбоцитов больше или равно  $50 \times 10^9/\text{л}$  и меньше  $100 \times 10^9/\text{л}$ . В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS количество тромбоцитов меньше  $50 \times 10^9/\text{л}$ .

В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS абсолютное количество нейтрофилов больше или равно  $0,8 \times 10^9/\text{л}$ . В соответствии с некоторыми воплощениями, у пациента с MDS абсолютное количество нейтрофилов меньше  $0,8 \times 10^9/\text{л}$ .

В соответствии с некоторыми воплощениями тасквинимод предназначен для применения в способе лечения, который подразумевает улучшение одного или более гематологических показателей у млекопитающего, страдающего MDS или подверженного риску развития MDS (например, у пациента-млекопитающего, страдающего MDS). Такое улучшение гематологических показателей может быть выбрано из снижения количества миобластов, повышения гемоглобина, повышения количества тромбоцитов, повышения количества нейтрофилов, снижения гепсидина, уменьшения числа единиц переливаемых эритроцитов, уменьшения частоты переливаний и уменьшения зависимости от переливаний крови.

Как упоминалось выше, тасквинимод, его фармацевтически приемлемые соли, его дейтерированные формы, его кристаллические соли и фармацевтические композиции, содержащие соединения и их соли, а также способы получения таких соединений, их солей, дейтерированных форм и фармацевтических композиций, содержащих соединения и их соли, описаны в WO 99/55678, WO 00/03991, WO 03/106424, WO 2005/074899, WO 2012/004338 и WO 2012/175541 (*vide supra*), которые включены в настоящую заявку в качестве ссылки во всей своей полноте.

В соответствии с некоторыми воплощениями любая ссылка на тасквинимод также включает его дейтерированную форму. Как указывалось выше, дейтерированная форма тасквинимода и способ получения такой формы описаны в WO 2012/175541. В соответствии с некоторыми воплощениями, таким образом, тасквинимод имеет обогащение дейтерием в карбоксамид-N-метильной группе по меньшей мере 70%, более

предпочтительно по меньшей мере 90%.

В соответствии с некоторыми воплощениями, тасквинимод не дейтерирован, и содержание дейтерия в нем соответствует природному содержанию дейтерия.

Настоящее изобретение включает тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль, приготовленную в виде фармацевтической композиции, возможно совместно с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, носителем, для применения при лечении MDS.

В соответствии с некоторыми воплощениями применяется фармацевтически приемлемая соль тасквинимода.

Фармацевтическая композиция может быть пригодной для энтерального введения, такого как ректальное или пероральное введение, или для парентерального введения млекопитающему (особенно человеку), и содержать терапевтически эффективное количество тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли в качестве активного ингредиента, возможно в сочетании с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например, фармацевтически приемлемым носителем. Терапевтически эффективное количество активного ингредиента является таким, как определено здесь выше, и зависит, например, от вида млекопитающего, массы тела, возраста, индивидуального состояния, индивидуальных фармакокинетических данных и способа введения.

Для энтерального, например, перорального введения, тасквинимод может быть приготовлен в самых разнообразных лекарственных (дозированных) формах. Фармацевтически приемлемые носители могут быть твердыми или жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, леденцы, капсулы, облатки, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ, которые также могут действовать как разбавители, ароматизаторы, солюбилизаторы, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, связующие вещества, консерванты, средства улучшения распадаемости, или инкапсулирующий материал. В порошках носитель обычно представляет собой тонкоизмельченное твердое вещество, представляющее собой смесь с тонкоизмельченным активным компонентом. В таблетках активный компонент обычно смешивают с носителем, обладающим необходимой связующей способностью, в подходящих пропорциях и прессуют до нужной формы и размера. Подходящие носители включают, но не ограничиваются указанными, карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, низкоплавкий воск, масло какао и подобные вещества.

Другие формы, подходящие для перорального введения, включают препараты в жидкой форме, в том числе эмульсии, сиропы, эликсиры, водные растворы, водные суспензии, или препараты в твердой форме, которые предназначены для преобразования в препараты в жидкой форме незадолго до применения. Эмульсии можно приготовить в растворах, например, в водных растворах пропиленгликоля, или они могут содержать эмульгаторы, например, такие как лецитин, моноолеат сорбитана или аравийская камедь. Водные растворы можно приготовить путем растворения активного компонента в воде и добавления подходящих красителей, ароматизаторов, стабилизаторов и загустителей. Водные суспензии можно приготовить путем диспергирования тонкоизмельченного активного компонента в воде с вязким материалом, таким как натуральные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и другие хорошо известные суспендирующие средства. Препараты в твердой форме включают растворы, суспензии и эмульсии и могут содержать помимо активного компонента красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и натуральные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие средства и подобные.

Примеры композиций для ректального введения включают суппозитории, которые могут содержать, например, подходящее нераздражающее вспомогательное вещество, такое как масло какао, синтетические сложные эфиры глицеридов или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при обычных температурах, но разжижаются и (или) растворяются в ректальной полости, высвобождая лекарство.

Тасквинимод также можно вводить парентерально, например, путем инъекции или инфузии, например, путем внутривенной, внутриартериальной, внутрикостной, внутримышечной, внутримозговой, интрацеребровентрикулярной, интрасиновиальной, интрастеральной, подбололочечной, внутриочаговой, внутричерепной, внутриопухолевой, внутрикожной и подкожной инъекции или инфузии. Таким образом, для парентерального введения фармацевтические композиции могут быть в форме стерильного препарата для инъекций или инфузий, например, в виде стерильной водной или масляной суспензии. Эта суспензия может быть приготовлена в соответствии с методами, известными в данной области, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов (например, Tween® 80) и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций или инфузий может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций или инфузий в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. Например, фармацевтическая композиция может представлять собой раствор в 1,3-бутандиоле. Другие примеры приемлемых носителей и растворителей,

которые можно использовать в композициях по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются, маннитол, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Дополнительно, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, подходят для приготовления препаратов для инъекций, также как и натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных версиях. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергатор в форме спирта с длинной цепью.

Растворы для парентерального применения также могут содержать подходящие стабилизаторы и, при необходимости, буферные вещества. Подходящие стабилизаторы включают антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, по отдельности или совместно, лимонная кислота и ее соли и ЭДТА натрия. Парентеральные растворы могут также содержать консерванты, такие как бензалкония хлорид, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол.

Обычные процедуры выбора и приготовления подходящих фармацевтических составов описаны, например, в руководстве «Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design», M.B. Aulton, Churchill Livingstone, 2nd ed. 2002 (ISBN 0443055173, 9780443055171). Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты, например, носители, и способы приготовления лекарственных форм также описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, представляющем собой стандартное пособие в области разработки лекарственных препаратов.

Фармацевтические композиции (которые также могут называться здесь как фармацевтические составы или лекарственные средства) должны содержать терапевтически эффективное количество тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли, например, они могут содержать от приблизительно 1% до приблизительно 95%, предпочтительно от приблизительно 20% до приблизительно 90% тасквинимода или его соли вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. Обычно тасквинимод или его соль вводят в терапевтически эффективном количестве любым способом, принятым для препаратов, которые выполняют аналогичные функции.

В то время как, например, при необходимости можно осуществлять инъекцию или ректальное введение тасквинимода или его соли, пероральное введение обычно считается наиболее удобным.

Дозировка и частота введения, как правило, определяются лечащим врачом с должным учетом таких факторов, как пол, возраст, масса тела и относительное здоровье подлежащего лечению субъекта, тяжесть MDS, выбранный путь и форма введения, дополнительное применение других лекарственных средств, например, в составе комбинированной терапии.

Как правило, суточная доза колеблется от минимальной дозы, составляющей 0,001 мг/кг массы тела, или 0,002 мг/кг массы тела, или 0,005 мг/кг массы тела, или 0,01 мг/кг массы тела, до максимальной дозы, составляющей 0,2 мг/кг массы тела, или 0,1 мг/кг массы тела, или 0,05 мг/кг массы тела, или 0,02 мг/кг массы тела.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,05 до 0,15 мг/сутки или от 0,08 до 0,1 мг/сутки, например, 0,1 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,1 до 0,3 мг/сутки или от 0,15 до 0,25 мг/сутки, например, 0,2 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,1 до 1 мг/сутки или от 0,2 до 0,8 мг/сутки, например, 0,5 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,2 до 1,5 мг/сутки или от 0,4 до 1,2 мг/сутки, например, 0,8 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,5 до 2 мг/сутки или от 0,8 до 1,2 мг/сутки, например, 1 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 0,8 до 3 мг/сутки или от 1 до 2,5 мг/сутки, например, 2 мг/сутки.

В соответствии с одним воплощением, тасквинимод вводят в количестве от 1 до 6 мг/сутки или от 2 до 4 мг/сутки, например, 3 мг/сутки.

В соответствии с некоторыми воплощениями дозировка может постепенно корректироваться для достижения оптимальных результатов, что называется титрованием дозы. Например, титрование дозы может начинаться с низкой суточной дозы, т.е. 0,25 мг и поддерживать этот уровень дозы в течение 1 или 2 недель. В случае отсутствия значимых побочных эффектов, которые могли бы стать противопоказанием для повышения дозы, уровень может быть повышен, например, до 0,5 мг/сутки в течение 1 или 2 недель, после чего можно предусмотреть еще одно повышение, чтобы достичь суточной дозы 1 мг, и так далее. При использовании такого метода, если после постепенного увеличения дозировки возникают какие-либо значимые побочные эффекты, доза может быть снова снижена до предыдущего уровня.

Побочные эффекты, которые могут возникнуть, включают те, которые обычно встречаются при данном типе лечения, например, желудочно-кишечные проблемы,

усталость и гриппоподобный синдром, которые, как считается, связаны с дозой.

Тасквинимод предпочтительно вводят ежедневно, т.е. 1-3 раза в сутки или 1-2 раза в сутки, например, один раз в сутки. В соответствии с некоторыми воплощениями препарат вводят реже, т.е. каждые два дня, раз в неделю и т.д. Следует также отметить, что, если вводят фармацевтически приемлемую соль тасквинимода, эквивалентной дозой будет такая доза, которая приводит к указанной дозе соединения в несолевой форме.

В самом широком смысле настоящее изобретение относится к тасквинимоду или его фармацевтически приемлемой соли для применения при лечении MDS. В соответствии с некоторыми воплощениями MDS выбран из любого подтипа, упомянутого выше в настоящем описании.

#### Биологические анализы

#### Материалы и методы

#### *Пациенты*

Образцы гепаринизированного костного мозга были получены от нелеченных пациентов с MDS (MDS низкого риска, MDS низкого риска с del5q, MDS высокого риска и CMML) во время стандартной диагностической аспирации, а также от гематологически здоровых доноров, перенесших операцию по замене тазобедренного сустава. Образцы анализировали на определение уровня S100A9 с использованием набора Human DuoSet ELISA (R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя.

#### *Культура клеток*

Моноядерные клетки костного мозга выделяли центрифугированием в градиенте перколла, а MSCs выращивали в виде прикрепленного монослоя в среде DMEM/10% FCS. Пассажи 2–5 использовали для экспериментов.

Чтобы имитировать воспалительные состояния, культивируемые *in vitro* MSCs обрабатывали рекомбинантным S100A8, S100A9 или гетеродимером S100A8/9 (в каждом случае по 1,5 мкг/мл) или TNF- $\alpha$  (10 нг/мл) в присутствии или в отсутствие тасквинимода (10 мкМ) в разные периоды времени в зависимости от последующих экспериментов. Гемопозитические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPCs) для совместных культур выделяли с использованием магнитных шариков, конъюгированных с CD34 антителами, в соответствии с инструкциями производителя (Miltenyi Biotec) и добавляли в среду CellGro (CellGenix), содержащую фактор стволовых клеток (SCF), FLT3-L и IL-3 (по 10 нг/мл).

Моноядерные клетки периферической крови (PBMCs) были приготовлены с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Нураque.

### *Клоногенные анализы*

Анализы CAF-C проводили в течение четырех недель с использованием предварительно обработанных слоев здоровых клеток или клеток MDS MSCs. В полную среду StemMACSTM HSC-CFU (Miltenyi Biotec) добавляли одну тысячу изолированных на магнитных шариках клеток CD34+.

Анализы КОЕ проводили с использованием клеток, собранных через одну неделю совместного культивирования, при этом 300 клеток помещали в среду, обогащенную метилцеллюлозой, с рекомбинантными цитокинами (MethoCult™ H4435, STEMCELL Technologies). Колонии через 2 недели подсчитывали и классифицировали под микроскопом или с помощью системы STEMvision™ (STEMCELL Technologies).

### *Анализ дифференцировки MSCs*

Способность к адипогенной и остеогенной дифференцировке является важной функциональной особенностью MSCs и часто изменяется при MDS, что приводит к изменениям в костном метаболизме. Таким образом, влияние тасквинимода на адипогенную и остеогенную дифференциацию оценивали следующим образом.

MSCs высевали в 6-луночные планшеты ( $5 \times 10^3$  MSCs/cm<sup>2</sup>), культивировали до субконфлюэнтности в течение примерно 4 дней в среде DMEM и подвергали адипогенной (0,5 мМ 1-метил-3-бутилизоксатина, 1 мкМ дексаметазона, 100 мкМ индометацина, 10 мкМ инсулина) или остеогенной (0,1 мкМ дексаметазона, 0,2 мМ аскорбат-2-фосфата, 10 мМ β-глицерофосфата) дифференцировке. Адипогенез оценивали окрашиванием Oil Red O через 21 день. Дифференцировку оценивали согласно микроскопическому анализу следующим образом: 0 = отсутствие дифференцировки; 1 = 25% культуральных лунок содержат дифференцированные клетки; 2 = 50% культуральных лунок содержат дифференцированные клетки; 3 = 75% лунок с культурой содержат дифференцированные клетки; 4 = 100% культуральных лунок содержат дифференцированные клетки. Остеогенез определяли окрашиванием Ван Косса, и определяли каталитическую активность ALP.

### *Определение уровней активных форм кислорода (ROS)*

Воспалительная микросреда миелодиспластического костного мозга приводит к повышению уровня ROS, что может привести к нарушению клеточной функции. Таким образом, влияние тасквинимода на уровни ROS в MSCs оценивают с использованием набора для анализа методом проточной цитометрии CellROX™ Deep Red Flow Cytometry Assay kit (Thermo Fisher) в соответствии с инструкциями производителя.

### *Профилирование метаболического внеклеточного потока в системе Seahorse*

Влияние тасквинимода на клеточный метаболизм исследуют с использованием

системы Seahorse (Agilent Technologies). MSCs высевают в 96-луночные планшеты Seahorse. Стресс-тест Cell Mito Stress Test (набор XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies) проводят в соответствии со стандартным протоколом. Скорость потребления кислорода (OCR) и скорость внеклеточного окисления (ECAR) определяют после введения олигомицина (1 мМ), карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP, 0,5 мМ) и комбинации ротенона и антимицина (Rot/AA, 0,5 мМ). OCR измеряют с помощью анализатора XF96 и программного обеспечения Wave (версия 2.2.0).

#### *Вестерн-блоттинг*

Цельные клеточные лизаты готовили с использованием буфера для лизиса RIPA, содержащего ингибиторы протеиназ. Концентрации белка определяли с использованием набора для анализа белка BCA Protein Assay Kit. Равные количества белков разделяли с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и переносили на поливинилиденфторидные мембраны для детекции специфических белков с использованием первых антител к IRAK1, NF- $\kappa$ B-p65, гасдермина и OXPHOS в течение ночи при 4°C, а затем вторых антител, а именно конъюгированных с HRP антител козы к IgG мыши (Invitrogen) или антител осли к IgG кролика (GE Healthcare), соответственно. Блоты инкубировали с реагентом ECL Plus Western Blotting (Amersham) и регистрировали сигналы с помощью системы визуализации LAS3000.

#### *RT-PCR*

РНК выделяли из MSCs с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) и обратно транскрибировали в кДНК с использованием набора для синтеза кДНК RevertAid™ (Thermo Fisher) с праймерами oligo-dT. Относительное целевое количество определяли методом сравнительного СТ ( $\Delta\Delta$ CT). RT-PCR проводили с использованием PCR-смеси SYBR Green/ROX PCR (Thermo) и целевых специфических праймеров для каспазы 1, IL1 $\beta$ , IL18, PD-L1, PD-1 и GAPDH в качестве гена «домашнего хозяйства» на приборе Taqman™ Fast 3500 cycler (Applied Biosystems). Ампликоны нормировали к эндогенному контролю GAPDH.

#### *Имуногистохимия*

Ткани костного мозга больных MDS и здоровых доноров характеризовали методом мультиплексной иммуногистохимии. С помощью этого метода последовательность и пространственное распределение MSCs CD271+, макрофагов CD68+ и нейтрофилов CD66b+ определяли за одно окрашивание и анализировали с помощью системы визуализации VECTRA®.

*Иммунофлуоресцентное окрашивание и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия*

MSCs, обработанные S100A9/тасквинимодом, фиксировали 4% параформальдегидом. Клетки пермеабилizировали с помощью PBS, содержащего 0,1% Triton™ X-100 (T-PBS), блокировали T-PBS, содержащим 10% FCS и 1% HSA (IF-буфер), и инкубировали в течение ночи при 4°C с антителами против  $\alpha$ SMA, NF $\kappa$ B или PD-L1. Вторые антитела, поликлональные овечьи антитела к Cy3 кролика или поликлональные антитела козы к Cy2 мыши, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Ядра клеток контрастно окрашивали DAPI. Анализ изображений выполняли методом конфокальной микроскопии (LSM800, Carl Zeiss) с программным обеспечением ZEN.

*Выделение и характеристика внеклеточных везикул (EV) из MSCs, обработанных тасквинимодом*

EV играют важную роль в межклеточной коммуникации. Эти небольшие частицы, окруженные мембраной, содержат различные биологически активные вещества, такие как малые РНК, мРНК и белки. Они происходят из эндосомального компартмента или отпочковываются непосредственно от клеточной мембраны. Чтобы проверить влияние S100A9 и тасквинимода на EV, производные от MSCs, их выделяют из бессывороточных культуральных супернатантов с использованием набора ExoEasy Maxi (Qiagen). Концентрацию и размер EV определяют с помощью анализа отслеживания наночастиц (NTA) с использованием прибора ZetaView®. Митохондриальную РНК выделяют с помощью набора miRNeasy kit (Qiagen) и проводят анализы на приборе Taqman со специфическими праймерами, например, для miR-145 и miR-146a. Функциональное влияние примированных тасквинимодом/S100A9 EV, происходящих из MSCs, анализируют путем инкубации с PBMC или HSPC и последующего проведения проточной цитометрии.

**Результаты**

Более высокие уровни S100A9 были обнаружены в ВМ плазме пациентов с MDS по сравнению со здоровым контролем, причем самые высокие уровни были обнаружены у пациентов с MDS с низким риском (фиг. 1).

*In vitro* релевантная экспрессия мРНК S100A9 не обнаружена в культивируемых MSCs или здоровых MSCs, что позволяет предположить, что этот тип клеток не является основным источником S100A9 в микроокружении костного мозга. Вместо этого окрашивание ткани костного мозга продемонстрировало экспрессию S100A8 и S100A9 в основном CD66b+ нейтрофилами и в меньшей степени CD68+ макрофагами.

Обработка MDS MSCs с помощью S100A9 индуцировала нисходящую передачу

сигналов TLR4, о чем свидетельствует повышенная экспрессия IRAK1 и NF-κB-p65. Дополнительно, была обнаружена более высокая экспрессия гасдермина; гасдермин является индуктором пироптоза в обработанных S100A9 клетках. Добавление тасквинимода ингибировало экспрессию упомянутых белков, что указывало на ослабление индуцированного воспаления (фиг. 2).

Экспрессия мРНК провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β и IL-18, а также их активатора каспазы 1 увеличивалась в MSCs после обработки S100A9, и это увеличение ингибировалось в присутствии тасквинимода (фиг. 3).

PD-L1 как потенциальная расположенная ниже в каскаде мишень, способная ингибировать эффективный гемопоз при MDS, была индуцирована под действием S100A9 и могла подавляться тасквинимодом как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Отмечалось, что базовая экспрессия PD-L1 была заметно больше в CMML MSCs, чем в здоровых MSCs (фиг. 4). Удивительно, но подавление PD-L1 было отмечено в MSCs как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с CMML MDS при приеме тасквинимода даже в отсутствие S100A9. Это удивительно еще и потому, что ранее сообщалось, что тасквинимод повышает экспрессию PD-L1 (Oncoimmunology 2016, Vol. 5, No. 6, e1145333).

Обработка S100A9 увеличивала экспрессию αSMA в MSCs, что характерно для дифференцировки MSCs в миелофибробласты, присутствующие в микроокружении опухоли. Параллельно наблюдалась повышенная экспрессия NF-κB в ядре. Обработка тасквинимодом снижает экспрессию как αSMA, так и NF-κB.

Адипогенная дифференцировка часто патологически повышена в MDS MSCs. Добавление тасквинимода уменьшало количество адипоцитов на 25-50% после 14 дней культивирования в среде для дифференцировки, что показано с помощью Oil red O-положительных клеток.

Добавление TNF-α к культурам MSCs приводило к увеличению экспрессии IRAK1, NF-κB-p65 и гасдермина. Опять же, добавление тасквинимода ингибировало экспрессию этих белков (фиг. 5). Это также указывает на то, что действие тасквинимода на MSCs может быть не связано с S100A9.

Поскольку функциональные изменения MSCs, вызванные активацией инфламмасом, оказывают значительное влияние на прогрессирование MDS, был изучен потенциал воздействия тасквинимода на стромальные клетки для изменения их последующей поддержки нормального гемопоза. С этой целью использовали совместные культуры MSCs/HSPC *in vitro*, в которых слои стромы предварительно обрабатывали комбинациями S100A9 и тасквинимода. Очевидно, что обработка S100A9 уменьшала

количество CAF-C, а также количество CFU в последующем клоногенном анализе, что указывает на нарушение поддержки гемопоэза клетками MSCs. Тасквинимод может увеличить как количество CAF-C, так и КОЕ (фиг. 6а-с).

Экспрессия PD-1 (рецептор для PD-L1) в совместно культивируемых HSPCs регулировалась таким же образом, как и его лиганда в обработанных MSCs.

Из приведенных выше данных следует, что патологическая воспалительная активация в миелодиспластическом костном мозге может быть купирована тасквинимодом путем ингибирования передачи сигналов NF- $\kappa$ B-p65 и экспрессии PD-L1/PD-1 в MSCs. Эти эффекты приводят к улучшению гемоатопозитической поддержки MSCs и, таким образом, к улучшению при анемии и цитопении у пациентов с MDS.

Наконец, результаты анализа дифференцировки MSCs показывают, что тасквинимод способен уменьшать адипогенную дифференцировку и улучшать остеогенную дифференцировку. Результаты анализа методом проточной цитометрии CellROX™ Deep Red Flow Cytometry Assay показывают, что тасквинимод может блокировать повышенные уровни ROS в MSCs. Результаты профилирования метаболического внеклеточного потока в системе Seahorse показывают, что эффект тасквинимода приводит к снижению клеточного стресса и улучшению резервного дыхательного объема, что является показателем метаболической приспособленности клеток.

#### *Валидация in vivo полученных in vitro результатов*

Многообещающие результаты in vitro подтверждаются in vivo на различных мышиных моделях. В этих моделях генетически модифицированные мыши (например, B6;129-*Trp53bp1<sup>tm1Jc</sup>/J* и NUP98/HOXD13), у которых развиваются типичные признаки MDS, такие как анемия и цитопения, получают тасквинимод. Еженедельно регистрируют показатели периферической крови, а костный мозг анализируют через 20 недель. Эти эксперименты показывают, что тасквинимод способен частично восстанавливать функциональный гемопоэз.

Более того, иммунодефицитным мышам NSG трансплантируют HSPCs, которые были совместно культивированы с предварительно обработанными MSCs, как описано выше, для анализа потенциального улучшения приживления клеток, полученных из предварительно обработанных тасквинимодом совместных культур. Периферическую кровь реципиентов получают каждые 3-4 недели путем венепункции ретроорбитального венозного сплетения и анализируют количество клеток человека методом проточной цитометрии после окрашивания антителами против CD45 и CD34 человека. Заключительный анализ костного мозга проводят через 20 недель.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения при лечении миелодиспластического синдрома (MDS) у млекопитающих.
2. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 1, где лечение осуществляют путем перорального введения.
3. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 1 или п. 2, где лечение осуществляют путем введения тасквинимода в количестве от 0,001 мг до 0,2 мг на килограмм массы тела в сутки или соответствующего количества его фармацевтически приемлемой соли
4. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-3, где лечение осуществляют путем введения тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли 1-3 раза в сутки.
5. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-4, где тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль вводят в составе твердой лекарственной формы.
6. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 5, где твердая лекарственная форма представляет собой капсулу, таблетку или пилюлю.
7. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-4, где тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль вводят растворенными или суспендированными в жидком носителе.
8. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-7, где лечение дополнительно включает лучевую терапию и/или трансплантацию аутологичных стволовых клеток.
9. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-8, где MDS выбран из MDS с однолинейной (монолинейной) дисплазией, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS, ассоциированного с изолированной хромосомной аномалией del, такого как MDS с изолированной del(5q), MDS с избытком бластов и MDS, не поддающегося классификации.
10. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS с однолинейной (монолинейной) дисплазией.
11. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS с мультилинейной дисплазией.
12. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS).

13. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS, ассоциированный с изолированной хромосомной аномалией del.

14. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS с избытком бластов.

15. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 9, где MDS представляет собой MDS, не поддающиеся классификации.

16. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-15, где MDS представляет собой MDS очень низкого риска, MDS низкого риска, MDS промежуточного риска, MDS высокого риска или MDS очень высокого риска.

17. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 16, где MDS представляет собой MDS очень низкого риска.

18. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 16, где MDS представляет собой MDS низкого риска.

19. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 16, где MDS представляет собой MDS промежуточного риска.

20. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 16, где MDS представляет собой MDS высокого риска.

21. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 16, где MDS представляет собой MDS очень высокого риска.

22. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 1, где MDS включает хронический миеломоноцитарный лейкоз.

23. Тасквинимод или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 1-22 для улучшения одного или более гематологических показателей у пациента-млекопитающего, где улучшение включает снижение количества миобластов, повышение гемоглобина, повышение количества тромбоцитов, повышение количества нейтрофилов, снижение гепсидина, уменьшение числа единиц переливаемых эритроцитов, уменьшения частоты переливаний и уменьшения зависимости от переливаний крови.

24. Применение тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения миелодиспластического синдрома (MDS).

25. Применение по п. 24, где лекарственное средство подходит для перорального введения.

26. Применение по п. 24 или п. 25, где лекарственное средство подходит для

введения тасквинимода в количестве от 0,001 мг до 0,2 мг на килограмм массы тела в сутки или соответствующего количества его фармацевтически приемлемой соли.

27. Применение по любому из пп. 24-26, где лекарственное средство подходит для введения 1-3 раза в сутки.

28. Применение по любому из пп. 24-27, где лекарственное средство представляет собой твердую лекарственную форму.

29. Применение по п. 28, где твердая лекарственная форма представляет собой капсулу, таблетку или пилюлю.

30. Применение по любому из пп. 24-27, где лекарственное средство содержит тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль, растворенные или суспендированные в жидком носителе.

31. Применение по любому из пп. 24-30, где MDS выбран из MDS с однолинейной (монолинейной) дисплазией, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS, ассоциированного с изолированной хромосомной аномалией del, такого как MDS с изолированной del(5q), MDS с избытком blast и MDS, не поддающегося классификации.

32. Применение по любому из пп. 24-31, где MDS представляет собой MDS очень низкого риска, MDS низкого риска, MDS промежуточного риска, MDS высокого риска или MDS очень высокого риска.

33. Применение по п. 24, где MDS включает хронический миеломоноцитарный лейкоз.

34. Применение по любому из пп. 24-33, где лекарственное средство предназначено для улучшения одного или более гематологических показателей у пациента-млекопитающего, где улучшение включает снижение количества миобластов, повышение гемоглобина, повышение количества тромбоцитов, повышение количества нейтрофилов, снижение гепсидина, уменьшение числа единиц переливаемых эритроцитов, уменьшения частоты переливаний и/или уменьшения зависимости от переливаний крови

35. Способ лечения миелодиспластического синдрома (MDS) у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, путем введения млекопитающему терапевтически эффективного количества тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли.

36. Способ по п. 35, где лечение осуществляют путем перорального введения.

37. Способ по п. 35 или п. 36, где лечение осуществляют путем введения тасквинимода в количестве от 0,001 мг до 0,2 мг на килограмм массы тела в сутки или соответствующего количества его фармацевтически приемлемой соли.

38. Способ по любому из пп. 35-37, где лечение осуществляют путем введения

тасквинимода или его фармацевтически приемлемой соли 1-3 раза в сутки.

39. Способ по любому из пп. 35-38, где тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль вводят в составе твердой лекарственной формы.

40. Способ по п. 39, где твердая лекарственная форма представляет собой капсулу, таблетку или пилюлю.

41. Способ по любому из пп. 35-38, где тасквинимод или его фармацевтически приемлемую соль вводят растворенными или суспендированными в жидком носителе.

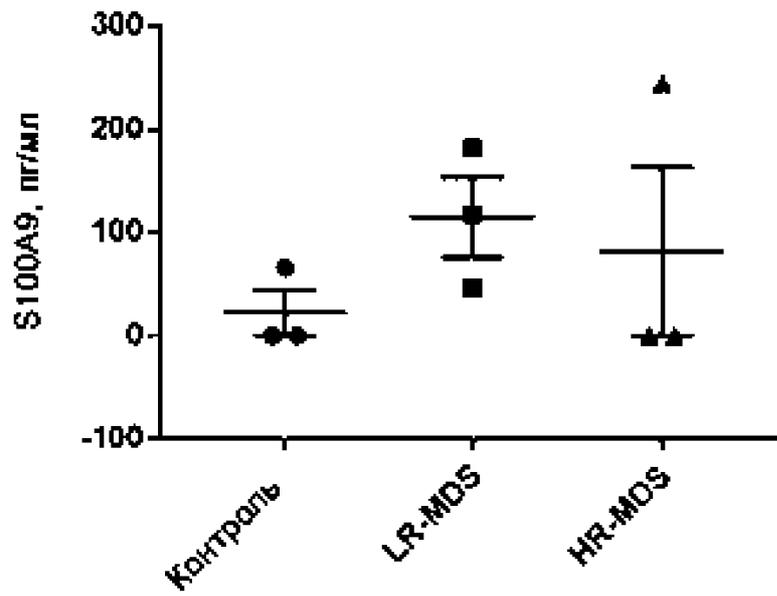
42. Способ по любому из пп. 35-41, где лечение дополнительно включает лучевую терапию и/или трансплантацию аутологичных стволовых клеток.

43. Способ по любому из пп. 35-42, где MDS выбран из MDS с однолинейной (монолинейной) дисплазией, MDS с мультилинейной дисплазией, MDS с кольцевыми сидеробластами (MDS-RS), MDS, ассоциированного с изолированной хромосомной аномалией del, такого как MDS с изолированной del(5q), MDS с избытком бластов и MDS, не поддающегося классификации.

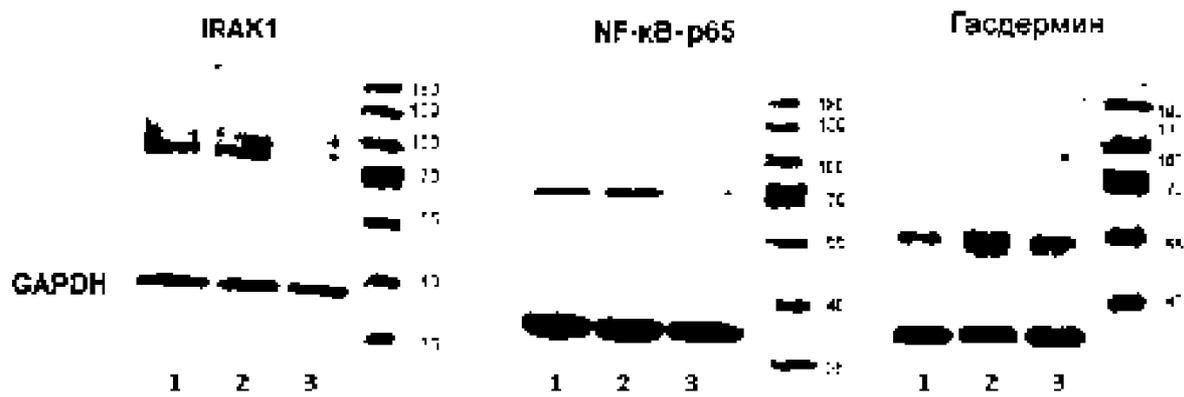
44. Способ по любому из пп. 35-43, где MDS представляет собой MDS очень низкого риска, MDS низкого риска, MDS промежуточного риска, MDS высокого риска или MDS очень высокого риска.

45. Способ по п. 35, где MDS включает хронический миеломоноцитарный лейкоз.

46. Способ по любому из пп. 35-45 для улучшения одного или более гематологических показателей у пациента-млекопитающего, где улучшение включает снижение количества миобластов, повышение гемоглобина, повышение количества тромбоцитов, повышение количества нейтрофилов, снижение гепсидина, уменьшение числа единиц переливаемых эритроцитов, уменьшения частоты переливаний и уменьшения зависимости от переливаний крови.

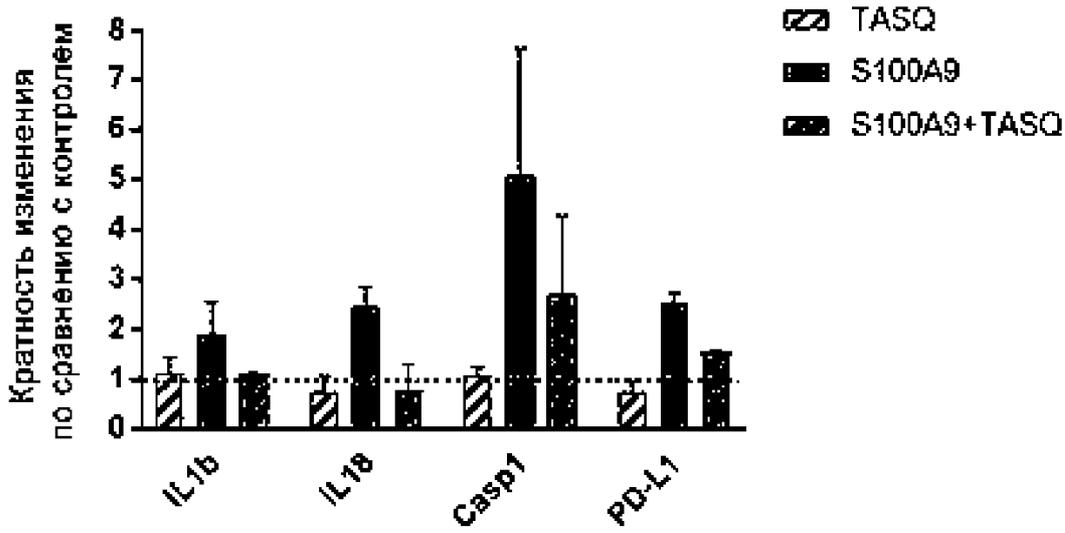


ФИГ. 1

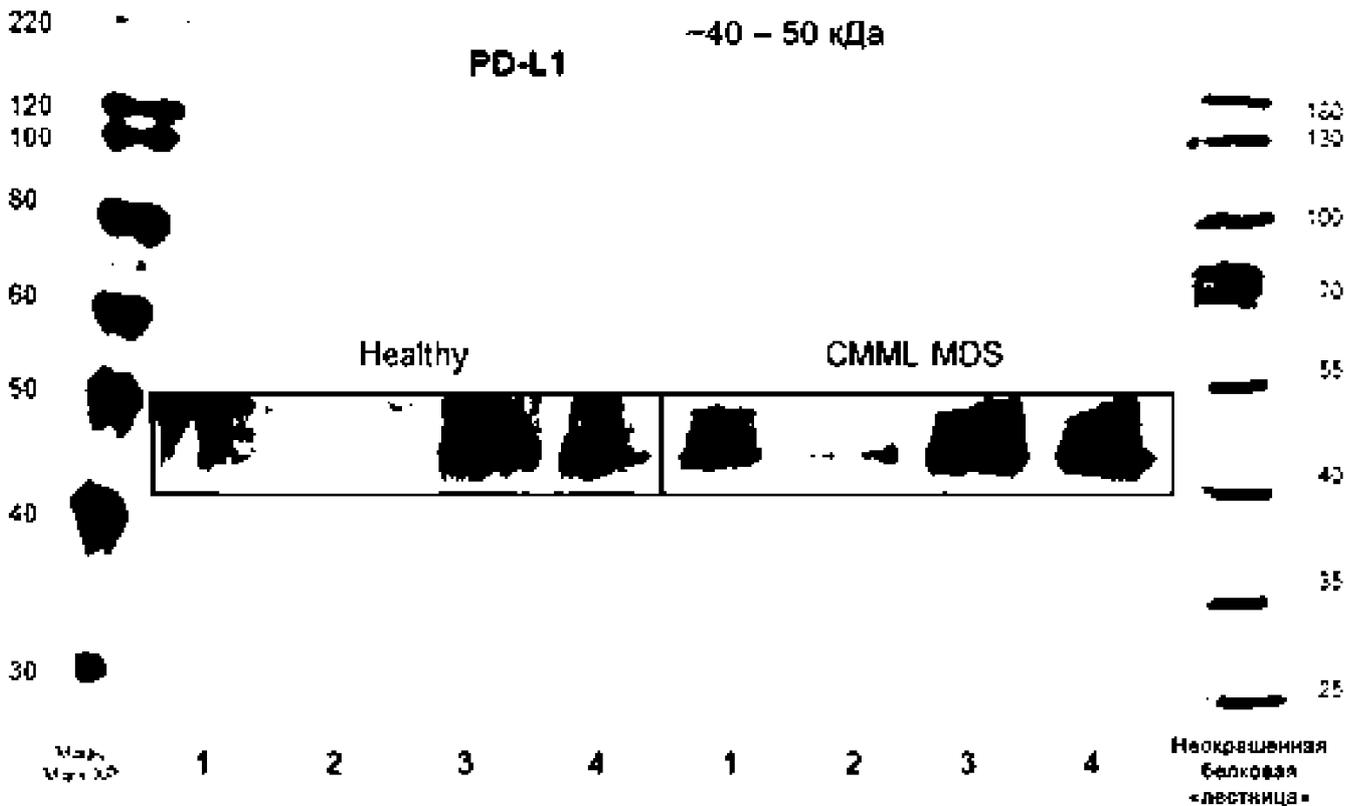


Дорожка 1: необработанный контроль  
 Дорожка 2: S100A9  
 Дорожка 3: S100A9/TASQ

ФИГ. 2

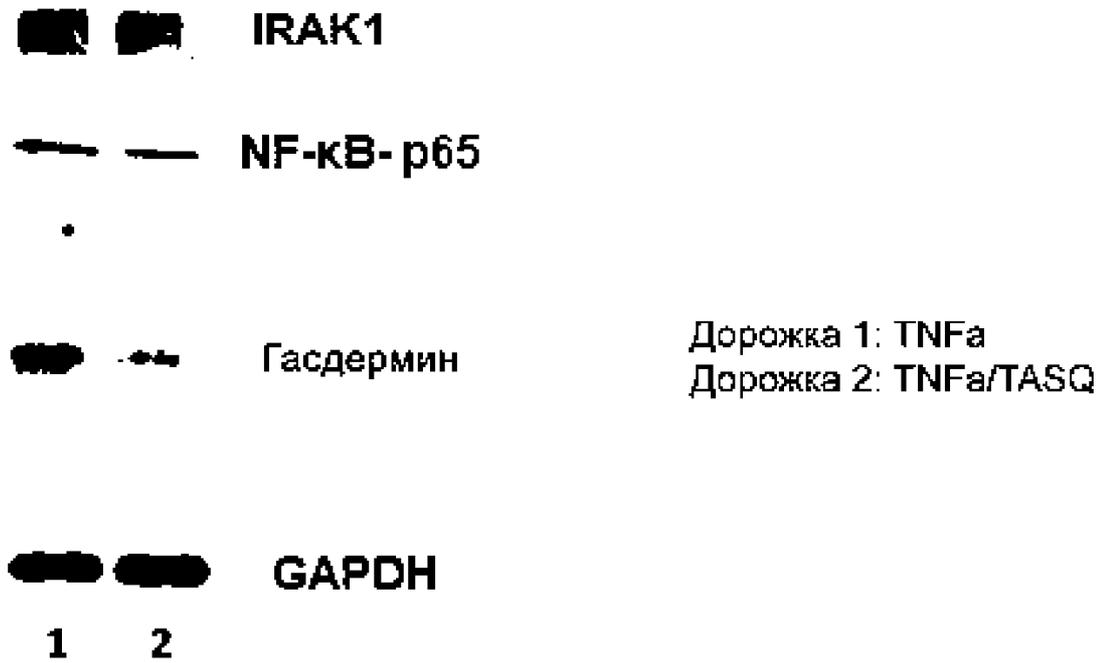


ФИГ. 3

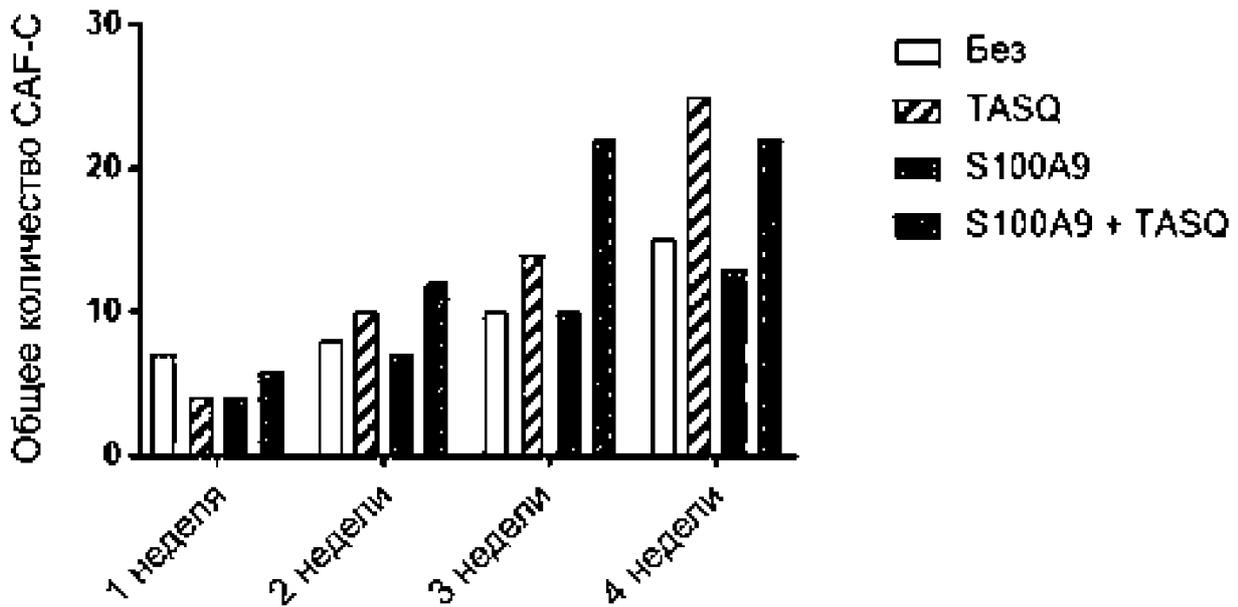


Дорожка 1: необработанный контроль;  
 Дорожка 2: TASQ  
 Дорожка 3: S100A9  
 Дорожка 4: S100A9/TASQ

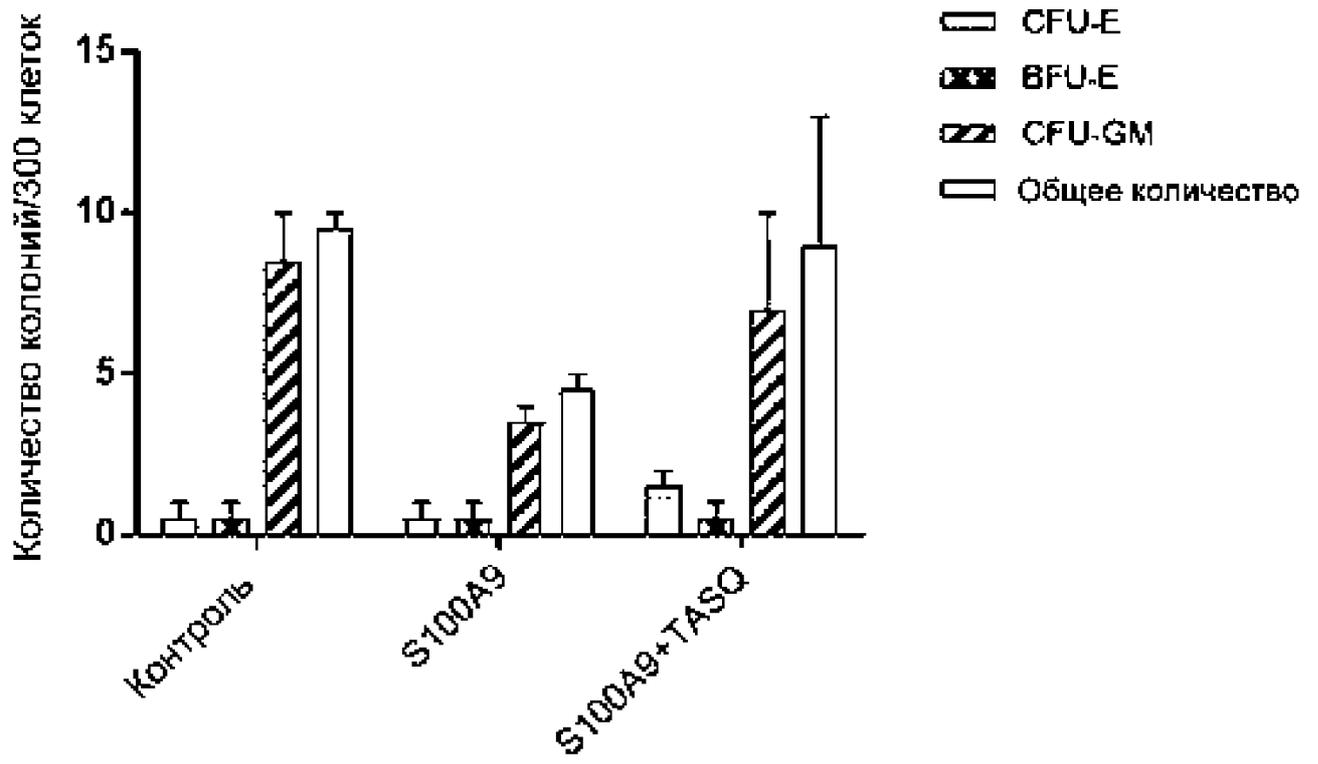
ФИГ. 4



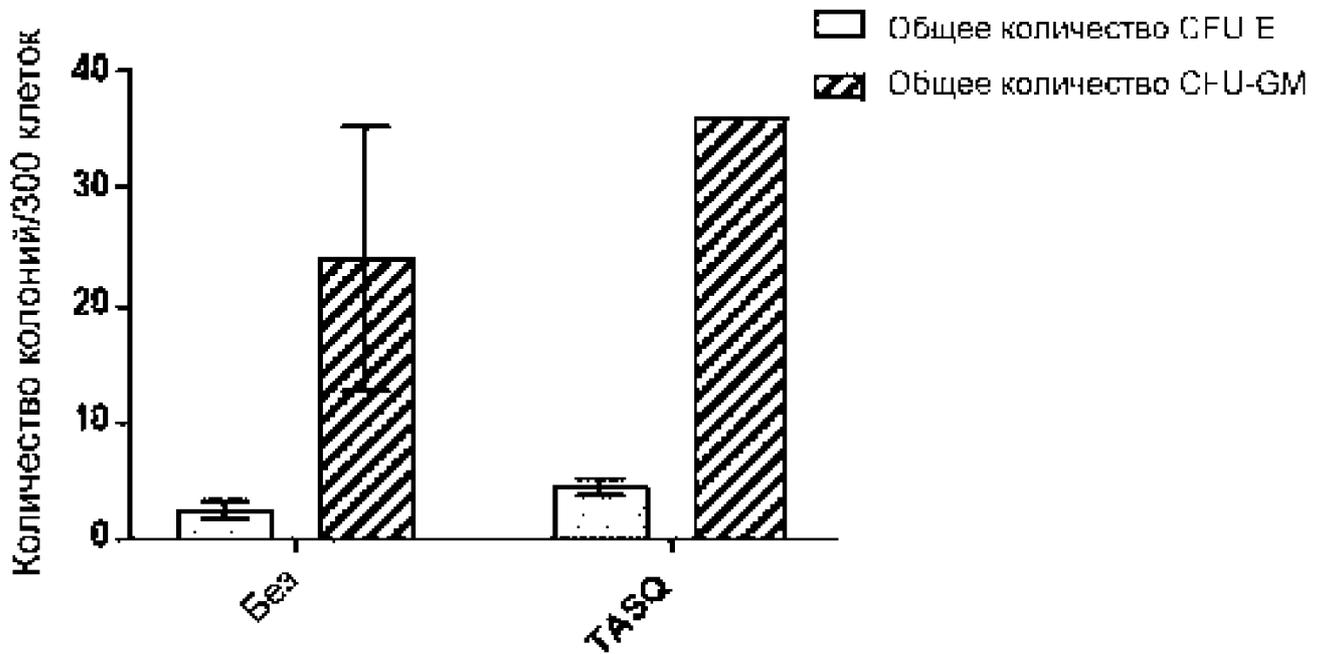
Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 6С