

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392954 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.11(22) Дата подачи заявки
2022.04.19(51) Int. Cl. A61K 31/41 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР HDAC6 И ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН ИНГИБИТОР КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ CTLA4

(31) 102021000009926

(32) 2021.04.20

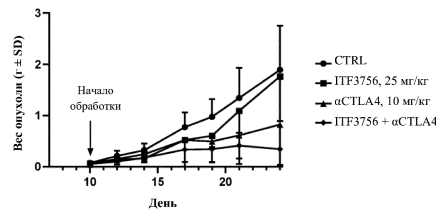
(33) IT

(86) PCT/EP2022/060287

(87) WO 2022/223543 2022.10.27

(71) Заявитель:
ИТАЛЬФАРМАКО С.П.А. (IT)(72) Изобретатель:
Фоссати Джанлука, Леони Флавио,
Поцци Пьетро Самуэле, Гальбьяти
Элизабетта, Стейнкулер Кристьян
(IT)(74) Представитель:
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Изобретение относится к комбинации, содержащей N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4, применимый при иммунотерапии опухолей и при лечении одного или более опосредованных HDAC6 заболеваний.



202392954

A1

A1

202392954

P102096661EB

КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОР HDAC6 И ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДИН ИНГИБИТОР КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ CTLA4

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4, применимый при иммунотерапии опухолей и при лечении одного или более опосредованных HDAC6 заболеваний.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид (в данном документе также обозначаемый как ITF3756) представляет собой соединение 8, раскрытое в WO2018/189340, в котором также раскрыт его способ синтеза и его активность в качестве ингибитора HDAC6 и в лечении отторжения трансплантата, GVHD, миозита, заболеваний, ассоциированных с аномальной функцией лимфоцитов, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, периферической нейропатии, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний, рака и нейродегенеративных патологий.

Класс HDAC человека состоит из 18 ферментов, разделенных на две группы: цинк-зависимые HDAC и NAD-зависимые HDAC, также известные как сиртуины (класс III). Цинк-зависимые HDAC дополнительно распределены на четыре класса: 1) класс I, включающий HDAC1, 2, 3 и 8, универсальные изоферменты, в основном находящиеся в ядре; 2) класс IIa, включающий HDAC4, 5, 7 и 9, изоферменты, находящиеся как в ядре, так и в цитоплазме; 3) класс IIb, включающий HDAC6 и HDAC10, в основном находящийся в цитоплазме, и 4) класс IV, включающий только HDAC11. В отличие от HDAC класса I, класс IIa и IIb характеризуются тканеспецифической экспрессией.

Селективные ингибиторы для семейства HDAC или для конкретной изоформы, особенно HDAC6, в частности, могут быть применимы для лечения патологий,

связанных с пролиферативными нарушениями и накоплением белков, нарушениями иммунной системы и неврологическими и нейродегенеративными заболеваниями, такими как инсульт, болезнь Хантингтона, ALS и болезнь Альцгеймера.

В частности, для изоформы HDAC6 были идентифицированы разные субстраты, такие как α -тубулин, Hsp90 (белок теплового шока 90), кортактин, β -катенин. Модуляция ацетилирования таких белков с помощью HDAC6 коррелировала с несколькими важными процессами, такими как иммунный ответ (J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078), регуляция динамического поведения микротрубочек, в том числе миграции клеток, и межклеточного взаимодействия (Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824), а также расщепление деградированных белков.

Кроме того, HDAC6 вовлечен в процесс катаболизма разрушенных белков посредством комплекса, известного как агресома: HDAC6 способен связываться с полиубиквитинированными белками и динеином, таким образом, активируя тип доставки денатурированных белков вдоль микротрубочек в агресому (Kawaguchi et al., Cell (2003) 115 (6), 727-738).

Изменения этой HDAC6 цитопротекторной активности коррелирует с разными нейродегенеративными патологиями, такими как болезнь Паркинсона (Outerio et al., Science (2007), 317 (5837), 516-519) и болезнь Хантингтона (Dompiere et al., J. Neurosci. (2007), 27(13), 3571-3583), где накопление разрушенных белков является общим патологическим признаком.

Более того, HDAC6 участвует в регуляции многих онкологических белков, особенно при гематологических опухолях, таких как разные типы лейкоза (Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905) и множественная миелома (Hideshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572). Регуляция ацетилирования α -тубулина с помощью HDAC6 может иметь отношение к началу метастазирования, где подвижность клеток играет важную роль (Sakamoto et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824). Недавно HDAC6 обратил на себя интерес в качестве новой мишени иммуноонкологии, благодаря тому факту, что было показано, что данный фермент является обязательным регулятором экспрессии белка иммунных контрольных точек PD-L1 (Lienlaf et al. Mol Oncol 2016 May;10(5):735-750). Было показано, что ингибиторы HDAC6 эффективны в

доклинических иммуноонкологических моделях и повышают активность антител к PD-1 (Ray et al., *Leukemia* 2018 Mar;32(3):843-846. Keremu et al *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Feb;83(2):255-264. Knox et al. *Sci Rep.* 2019 Apr 16;9(1):6136).

CTLA4 или CTLA-4 (белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами) представляет собой белковый рецептор, который функционирует в качестве иммунной контрольной точки и снижает иммунные ответы. CTLA4 конститутивно экспрессируется в регуляторных Т-клетках, но активируется только в обычных Т-клетках после активации, представляя собой явление, которое является особенно заметным при различных видах рака. Он выступает в качестве «выключателя» при связывании с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток.

Имеет место растущий интерес к возможным терапевтическим преимуществам блокирования CTLA4 (с использованием антагонистических антител к CTLA4). Ипилимумаб представлял собой первое антитело к CTLA4, одобренное Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в марте 2011 г. для лечения меланомы. FDA также одобрило терапию ипилимумабом, направленную против CTLA4, в дозе 3 мг/кг плюс терапию ниволумабом, направленную против PD-1, в дозе 1 мг/кг для пациентов с прогрессирующей меланомой. Было показано, что эта схема приводит к повышению выживаемости, замедлению прогрессирования и повышению доли пациентов, достигающих объективного ответа, по сравнению с монотерапией ипилимумабом (Larkin J et al. *n engl j med* 381;16 2019). Однако эти преимущества сопровождались повышенной токсичностью, включая высокую долю связанных с лечением нежелательных явлений 3/4 степени тяжести. Например, лечение ниволумабом ассоциировано со следующими нежелательными явлениями: нефрит, гепатит, панкреатит и пневмонит (Kang JH et al. *Trends in Immunology* 42, 293, 2021).

Большой интерес был проявлен к комбинации ингибиторов контрольных точек с другими средствами. Безусловно, цель заключается в обнаружении другого подходящего средства. В мире рака легких, а теперь и рака молочной железы, а также других заболеваний, при которых химиотерапия является эффективной, исследователи рассматривают комбинацию химиотерапии с терапией ингибиторами иммунных контрольных точек, которая привела к некоторому успеху.

Однако, имели место некоторые неудачные попытки, такие как исследование фазы III пембролизумаба (антитело к PD-1) и ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1) эпикадостата у пациентов с меланомой, которое было прекращено в апреле 2018 г., поскольку комбинированная терапия не позволила достичь первой первичной конечной точки в виде улучшения выживаемости без прогрессирования по сравнению с монотерапией пембролизумабом.

С механистической точки зрения было логично, что эта комбинация будет приводить к приемлемым результатам, однако очевидная неудача этой комбинации отчетливо указывает на то, что исследователям необходимо лучше проверять комбинации, которые продвигаются в разработке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, целью настоящего изобретения является получение новой комбинации, которая сохраняет или улучшает терапевтическую эффективность известных и одобренных комбинаций и/или лекарственных средств, вводимых индивидуально, но которая в то же время имеет лучший токсикологический профиль.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация, содержащая ITF3756 и антитело к CTLA4, демонстрирует противоопухолевый эффект, превосходящий введение отдельных лекарственных средств, и указанная комбинация демонстрирует синергический терапевтический эффект. В частности, наиболее выраженный противоопухолевый эффект был получен при введении 50 мг/кг ITF3756 три раза в день в комбинации с 10 мг/кг средства, направленного против CTLA4, что также предупреждало бы развитие вторичных опухолей.

Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что комбинированное лечение в соответствии с настоящим изобретением может характеризоваться лучшим профилем безопасности, чем комбинация средства, направленного против CTLA4, и средства, направленного против PD1, или комбинация средства, направленного против CTLA4, и средства, направленного против PD-L1, сохраняя при этом ту же эффективность в отношении ингибирования опухолевого роста.

Соответственно, первым объектом настоящего изобретения является комбинация, содержащая N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его

фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4.

Второй целью настоящего изобретения является указанная комбинация для применения в качестве лекарственного препарата.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- На **фигуре 1** показано влияние обработки ITF3756 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 2** показано влияние Mab к CTLA4 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 3** показано влияние ITF3756 в дозе 25 мг/кг в комбинации с Mab к CTLA4 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 4** показано влияние ITF3756 в дозе 50 мг/кг в комбинации с Mab к CTLA4 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 5** показано влияние ITF3756 в дозе 50 мг/кг x3 в комбинации с Mab к CTLA4 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 6** показано влияние длительного введения ITF3756 в дозе 50 мг/кг три раза в день и один раз в день в комбинации с Mab к CTLA4 на рост опухоли CT26 у мыши.

- На **фигуре 7** показано влияние предыдущего введения ITF3756 в комбинации со средством, направленным против CTLA4, на рост вторичных опухолей (опухолевую стимуляцию) в мышинной модели CT26.

- На **фигурах 8А-8В** показано влияние предыдущего введения ITF3756 (50 мг/кг один раз в день) в комбинации со средством, направленным против CTLA4 (10 мг/кг), на рост вторичных опухолей (опухолевую стимуляцию) в мышинной модели CT26.

- На **фигурах 9А-9В** показано влияние предшествующего введения ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) в комбинации со средством, направленным против CTLA4 (10 мг/кг), на рост вторичных опухолей в мышинной модели CT26.

- На **фигуре 10** показано влияние ITF3756 в комбинации со средством, направленным против CTLA4, на предупреждение опухолевого роста по сравнению с комбинацией средство, направленное против PD-1, + средство, направленное против CTLA4.

- На **фигуре 11** показано влияние ITF3756 отдельно или в комбинации со средством, направленным против CTLA4, на диабет у самок мышей NOD.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, предусмотрено, что все термины из области техники, условные сокращения и другая научная терминология, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понимаемые специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В некоторых случаях для ясности и/или для сведений справочного характера в данном документе определены термины с обычно понимаемыми значениями; таким образом, в случае включения таких определений в данный документ не должно рассматриваться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области.

Термин **«физиологически приемлемое вспомогательное вещество»** в данном документе относится к веществу, которое само по себе не обладает каким-либо фармакологическим эффектом и которое не вызывает нежелательных реакций при введении млекопитающему, предпочтительно человеку. Физиологически приемлемые вспомогательные вещества широко известны в уровне техники и раскрыты, например, в Handbook of Pharmaceutical Excipients, шестое издание, 2009, включенной в данный документ посредством ссылки.

Термин **«фармацевтически приемлемые соли»** в данном документе относится к тем солям, которые обладают биологической эффективностью и свойствами соединения, из которого получали соль, и которые не вызывают нежелательные реакции при введении млекопитающему, предпочтительно человеку. Фармацевтически приемлемые соли могут представлять собой неорганические или органические соли; примеры фармацевтически приемлемых солей включают без ограничения карбонат, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, гидросульфат, цитрат, малеат, фумарат, трифторацетат, 2-нафталинсульфонат и пара-толуолсульфонат. Дополнительную информацию касательно фармацевтически приемлемых солей можно найти в Handbook of pharmaceutical salts, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008, включенной в данный документ посредством ссылки.

Термин **«одновременное, раздельное или последовательное введение»** в данном документе относится к введению первого и второго соединения одновременно или

таким образом, что два соединения действуют в организме пациента одновременно, или к введению одного соединения после другого таким образом, чтобы обеспечить терапевтический эффект. В некоторых вариантах осуществления соединения принимают во время еды. В других вариантах осуществления соединения принимают после еды, например, через 30 минут или 60 минут после еды. В некоторых вариантах осуществления одно соединение вводят пациенту в течение некоторого периода времени, после чего следует введение другого соединения.

Термин **«ингибитор контрольной точки CTLA4»** или **«средство, направленное против CTLA4»** или **«антитело к CTLA4»** в соответствии с настоящей заявкой относится к любому соединению, способному ингибировать, частично или полностью, биологическую активность иммунной контрольной точки CTLA4 (белка 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами).

Термины «примерно» и «приблизительно» в данном документе относятся к диапазону экспериментальной ошибки, которая может возникнуть при измерении.

Термины «предусматривающий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует понимать как открытые термины (т.е. означающие «включающий без ограничения») и следует рассматривать как основу для терминов, таких как «по сути состоять из», «по сути состоящий из», «состоять из» или «состоящий из».

Термины «по сути состоит из», «по сути состоящий из» следует понимать как полузакрытые термины, означающие, что не включаются никакие другие ингредиенты, которые существенно влияют на основные и новые характеристики настоящего изобретения (следовательно, необязательные вспомогательные вещества могут быть включены).

Термины «состоит из», «состоящий из» следует понимать как закрытые термины.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как будет подробно раскрыто в экспериментальном разделе, авторы настоящего изобретения обнаружили, что лечебная комбинация ИТF3756 (25 мг/кг и 50 мг/кг) + средства, направленного против CTLA (10 мг/кг), приводила к более активному эффекту, чем введение отдельных лекарственных средств.

В частности, полученные данные демонстрируют синергический эффект комбинации введения ITF3756 и средства, направленного против CTLA4, по отношению к ITF3756 и средству, направленному против CTLA4, вводимым по отдельности.

Кроме того, авторы настоящего изобретения также обнаружили, что наиболее выраженный противоопухолевый эффект был получен при введении ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) в комбинации со средством, направленным против CTLA4 (10 мг/кг).

Полученные результаты позволяют предположить активацию иммунной системы, индуцированную комбинированным лечением. Фактически, комбинация настоящего изобретения приводит к предупреждению развития вторичных опухолей.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что ITF3756 приводит к снижению индуцированной цитокинами экспрессии PD-L1 в моноцитах человека, стимулированных *in vitro*, и что введение ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) приводило к снижению экспрессии PD-L1 в иммунных клетках мыши *in vivo*. Обработка мышей NOD антителами к PD-1, антителами к PD-L1 или комбинацией антител к PD-1 или антител к PD-L1 с антителом к CTLA4 приводит к значительному ускорению индукции аутоиммунного диабета, известного побочного эффекта клинической значимости. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что обработка мышей NOD ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) либо отдельно, либо в комбинации с антителом к CTLA4 не приводит к ускорению индукции аутоиммунного диабета, что позволяет предположить, что такая комбинированная обработка переносится гораздо лучше и будет вызывать меньше аутоиммунных нежелательных явлений по сравнению с комбинацией антител к PD(L)1 и антител к CTLA4.

Соответственно, первым объектом настоящего изобретения является комбинация, содержащая N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4.

В комбинации с предпочтительным вариантом осуществления указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 выбран из ипилимумаба или тремелиумаба.

Вторым объектом настоящего изобретения является комбинация в соответствии с

настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного препарата.

Предпочтительно комбинация является применимой для лечения любого заболевания или состояния, при котором возможно обеспечить улучшение или предупреждение с помощью лечения антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами PD-L1.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения комбинация является применимой для лечения пациента, который прекратил лечение антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1. В частности, пациент прекратил лечение антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1 вследствие токсичности.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения комбинация является применимой для лечения пациента, которого не лечат антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1. В частности, пациента не лечат антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1 вследствие предполагаемой токсичности.

Комбинация по настоящему изобретению является предпочтительно применимой для иммунотерапии опухолей и лечения опосредованных HDAC6 заболеваний.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения комбинация является применимой для лечения одного или более заболеваний, выбранных из группы: аденокарциномы, рака анального канала, астроцитомы, базальноклеточного рака кожи, рака мочевого пузыря, опухолей головного мозга, рака молочной железы, карциномы неизвестного происхождения, опухолей сердца, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, внутриглазной меланомы, рака маточных труб, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (GIST), эмбрионально-клеточных опухолей, рака яичка, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухолей островковых клеток, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, гистиоцитоза из клеток Лангерганса, лейкозов, рака легкого (немелкоклеточного, мелкоклеточного, плеврального, бластомы и трахеобронхиальной опухоли), меланомы, карциномы Меркеля, мезотелиомы, карциномы срединного тракта с изменениями гена NUT, синдромов множественной эндокринной неоплазии,

множественной миеломы/новообразований плазматических клеток, миелодиспластических синдромов, миелодиспластических/миелопролиферативных новообразований, нейробластомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, параганглиомы, рака паращитовидной железы, рака полового члена, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, первичного рака брюшины, рака предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, сарком, плоскоклеточного рака кожи, тимомы и карциномы вилочковой железы, рака щитовидной железы, переходноклеточного рака почечной лоханки и мочеточника, рака матки, рака влагалища, сосудистых опухолей, рака вульвы, опухоли Вильмса. Предпочтительно комбинация является применимой для лечения меланомы, рака молочной железы, почечно-клеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого и колоректального рака.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления комбинация для применения в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемая соль и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 предназначены для одновременного, отдельного или последовательного введения.

Предпочтительно N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту ежедневно, предпочтительно от 2 до трех раз в день и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 вводят пациенту каждые 2-4 недели, предпочтительно в максимальном количестве, составляющем 4 дозы.

Предпочтительно N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту перорально.

Предпочтительно ингибитор контрольной точки CTLA4 вводят посредством внутривенной инфузии.

Более предпочтительно N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль вводят пациенту в количестве от 200 мг до 1000 мг BID или от 100 до 1000 мг TID, и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 вводят пациенту в количестве от 0,5 до 10 мг/кг каждые 2-4 недели, предпочтительно от 1 до 3 мг/кг

каждые 2-4 недели.

Дозы ITF3756 для человека прогнозировали с использованием физиологически обоснованной фармакокинетической модели (PBPK) с помощью программного обеспечения GastroPlus™ (Simulation Plus, Ланкастер, Калифорния). Целевая $C_{\text{средняя}}$ для прогнозируемых доз составляла 200 нг/мл, что представляет собой средний уровень через 24 часа, обнаруженный после схемы введения, которая характеризовалась эффективностью у мыши.

Стратегия моделирования заключалась в изначальном создании и оценке моделей для видов животных, для которых были доступны экспериментальные данные по фармакокинетике *in vivo* (мышь, крыса, собака и яванский макак), а затем применении данных для конкретных видов и физиологических данных с последовательным масштабированием *in vitro* до развития подходов к прогнозированию фармакокинетике человека *in vivo*. Такая же работа была проделана в отношении ITF2357 (гивиностат), который представляет собой соединение с существующими клиническими данными и сходством в механизме элиминации с ITF3756, для подтверждения предположений, выполненных в отношении элиминации ITF3756.

Модель была создана с использованием физико-химических характеристик и данных ITF3756 *in vitro*, таких как LogD, pK_A, растворимость в воде и биорелевантных жидкостях, проницаемость, связывание с белками и распределение в крови и плазме крови, полученных для каждого вида.

Печеночный метаболизм изучали, исходя из данных, полученных *in vitro* после инкубации ITF3756 с видоспецифичными криоконсервированными гепатоцитами. Почечный и кишечный метаболизм определяли на основе данных *in vitro*, собранных после инкубации исследуемого препарата с видоспецифичными микросомами почки и кишечника с NADPH и UDPGA в качестве кофакторов. Затем проводили экстраполяции с уровня *in vitro* до уровня *in vivo* с использованием подходящих показателей масштабирования. Клиренс цельной крови использовали в качестве заменителя внепеченочного метаболизма.

Концентрации в тканях прогнозировали, предполагая, что все ткани выступают в качестве тщательно перемешиваемых компартментов с распределением, ограниченным скоростью перфузии, и специфическим в отношении лекарственного средства и ткани

коэффициентом распределения в плазме крови K_p . Значения K_p обычно прогнозировали на основе физико-химических свойств лекарственного средства и состава ткани.

Всасывание и прохождение через стенку кишечника прогнозировали с использованием модели ACAT (Advanced Compartmental Absorption and Transit), интегрированной в модель PBPK на уровне всего организма.

На первой стадии у каждого вида животных прогнозировали фармакокинетические параметры после внутривенного введения. Эмпирические коэффициенты масштабирования использовали для внепеченочного метаболизма для определения клиренса из организма и для LogD для определения объема распределения. На основе эмпирических коэффициентов масштабирования были обнаружены сценарии с низким и высоким уровнем очистки.

Затем моделировали фармакокинетику после перорального введения, обнаружив неопределенность в отношении проницаемости, растворимости и растворения вследствие межвидовой изменчивости. Затем излагали восемь сценариев, среди которых можно было найти сценарии перорального поглощения в наиболее и наименее приемлемом случае.

Затем выполняли прогнозы фармакокинетики для человека с использованием 8 сценариев, полученных на основе комбинации биодоступности в наиболее и наименее приемлемом случае, высокого и низкого клиренса, а также высокого и низкого объема распределения. В зависимости от того, какой из смоделированных сценариев наиболее приемлемо отражает фармакокинетику человека, схема введения дозы, прогнозируемая для достижения целевого воздействия, находится в диапазоне от 200 мг до 1000 мг BID или от 100 мг до 1000 мг TID, как указано выше.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано более подробно в следующем экспериментальном разделе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

ПРИМЕР 1

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТ ITF3756, ВВОДИМОГО В КОМБИНАЦИИ С

АНТИТЕЛОМ К СТЛА4, В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ СТ26

Противоопухолевую эффективность ИТФ3756, вводимого в комбинации с антителом к СТЛА4, определяли с использованием мышинной модели, основанной на использовании клеточной линии карциномы толстой кишки мышей СТ26. В этой модели клетки СТ26 имплантируют подкожно сингенным мышам, а эффективность определяют как ингибирование опухолевого роста на основе объема опухолевого узла.

Способы и методы*ИТФ3756 (N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид)*

ИТФ3756 синтезировали в отделе медицинской химии компании Italfarmaco SpA. ИТФ3756, партия 5, в виде порошка растворяли в DMSO и хранили при -20°C. В каждый день введения раствор разбавляли H₂O/PEG 400 в соотношении 1:1 с получением конечного раствора H₂O/PEG 400 в соотношении 1:1 в 0,5% DMSO с концентрацией 2,5 и 5,0 мг/мл.

Растворы вводили мышам перорально с помощью зондовых игл в объеме 200 мкл (конечные дозы 25 и 50 мг/кг).

Введение ИТФ3756 начинали, когда опухолевые узлы становились пальпируемыми (приблизительно в день 10 после инокуляции клеток). ИТФ3756 вводили перорально (os) один или три раза в день, как указано в таблице 1.

Антитело к СТЛА4

Mab на основе IgG сирийского хомячка к СТЛА4 мыши приобретали в BioXcell (№ по кат. BE0131, клон 9H10), разбавляли PBS до конечной концентрации 1, 0,3 и 0,1 мг/мл и хранили при +4°C. Каждой мышке вводили 200 мкл соответствующего раствора (конечные дозы 10,0, 3,0 и 1,0 мг/кг).

Введение Mab к СТЛА4 начинали, когда опухолевые узлы становились пальпируемыми (приблизительно в день 10 после инокуляции клеток). Средство, направленное против СТЛА4, вводили внутривенно (iv) один раз в день через день в общей сложности в течение 4 обработок с последующим периодом отмывания в течение 7 дней, как указано в таблице 1. Этот цикл обработки продолжали до конца исследования.

Исследование in vivo

Самок мышей BALB/c в возрасте 6 недель приобретали у Charles River Italia и содержали с предоставлением пищи и воды вволю при 12-часовом цикле света и темноты.

Через 5 дней после акклиматизации мышам вводили опухолевые клетки.

Клетки CT26 (карцинома толстой кишки BALB/c мышей, CT26.WT ATCC CRL-2638) выращивали в среде для культивирования клеток RPMI 1640 + 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS).

Клетки отделяли во время экспоненциальной фазы трипсином, промывали культуральной средой без FCS и суспендировали при конечной концентрации 5×10^6 клеток/мл. Клетки (1×10^6 клеток/мышь) вводили с.с. в паховую область правого бока мышей в объеме 200 мкл.

Когда опухолевый узел пальпировался по меньшей мере у 80% животных, мышей рандомизировали в следующие экспериментальные группы и начинали введение лекарственных средств.

Таблица 1. Экспериментальные группы и схемы обработки.

Номер группы (животные/группа)	Экспериментальная группа	Схема обработки
1 (n=6)	Контроль , среды-носители*	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
2 (n=3)	Контроль , среды-носители*	Перорально , 3 раза в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
3 (n=3)	Контроль , без обработки	-

4 (n=6)	ITF3756, 25 мг/кг	Перорально , один раз в день.
5 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг	Перорально , один раз в день.
6 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг	Перорально , 3 раза в день.
7 (n=6)	Средство, направленное против CTLA4, 1 мг/кг	ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
8 (n=6)	Средство, направленное против CTLA4, 3 мг/кг	ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
9 (n=6)	Средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг	ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
10 (n=6)	ITF3756, 25 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 1 мг/кг	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
11 (n=6)	ITF3756, 25 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 3 мг/кг	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
12 (n=6)	ITF3756, 25 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
13 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 1 мг/кг	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
14 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 3 мг/кг	Перорально , один раз в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
15 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг +	Перорально , один раз в день.

	средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг	ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней
16 (n=6)	ITF3756, 50 мг/кг + средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг	Перорально , 3 раза в день. ip , в общей сложности 4 введения через день, после чего следует период отмывания в течение 7 дней

*Контрольных животных обрабатывали перорально средой-носителем ITF3756 (H₂O/PEG 400 в соотношении 1:1+DMSO 0,5%) и ip средой-носителем на основе средства, направленного против CTLA4 (PBS).

Вес тела измеряли через день, начиная с первого дня введения лекарственного средства.

Объем подкожных опухолевых узлов определяли через день по следующей формуле (Papagiannoros A. et al. *in vivo* 20:129-136, 2006):

$$\text{Объем (мм}^3\text{)} = (D \times d^2)/2,$$

где D = большой диаметр узла и d = малый диаметр узла.

Вес опухолевого узла определяли с помощью объема опухоли с учетом плотности опухоли 1,05 г/мл (Jensen M.M. et al. *BMC Medical Imaging* 8(16), 2008).

Животных подвергали эвтаназии, когда вес опухоли равнялся 10% от веса тела или когда опухолевые узлы были изъязвленными (гуманные конечные точки).

Статистический анализ влияния лекарственных средств проводили методом 2-стороннего ANOVA с помощью критерия множественных сравнений Даннетта с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.

Результаты

Влияние ITF3756 на опухолевый рост CT26 обобщено на **фигуре 1**.

Доза 25 мг/кг (один раз в день) не характеризовалась значимым ингибированием опухолевого роста на протяжении всего экспериментального периода. Более высокая доза (50 мг/кг один раз в день) оказывала значимое влияние в день 21 день, при этом

ингибирование опухолевого роста составляло 34% (0,88 г и 1,34 г), которое больше не обнаруживали в день 24 (9% ингибирование).

В отличие от этого, у животных, обработанных ITF3756 в дозе 50 мг/кг 3 раза в день, наблюдали значимое уменьшение опухоли, начиная с дня 19 до дня 24 (30% ингибирование, 1,32 г и 1,89 г), что указывает на то, что эта схема обработки оказывала фармакологический эффект, который превосходил однократное ежедневное введение.

<i>Группа</i>	Статистическая значимость по сравнению с контрольной группой в день						
	10	12	14	17	19	21	24
ITF3756, 25 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ITF3756, 50 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
ITF3756, 50 мг/кг x3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**

n.s. = не значимо, * p<0,05, **p<0,01

Влияние антитела к CTLA4 обобщено на **фигуре 2**. Все 3 дозы антитела приводили к одинаковой активности с максимальным эффектом ингибирования опухоли в день 24 (66–57%).

<i>Группа</i>	Статистическая значимость по сравнению с контрольной группой в день						
	10	12	14	17	19	21	24
αCTLA4 1 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	***	***
αCTLA4 3 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	***
αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

n.s. = не значимо, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Влияние ITF3756, введенного в дозе 25 мг/кг, в комбинации с наиболее высокой дозой антитела к CTLA4 (10 мг/кг), представлено на **фигуре 3**.

<i>Группа</i>	Статистическая значимость по сравнению с контрольной группой в день						
	10	12	14	17	19	21	24
ITF3756 25 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	***
ITF3756 25 мг/кг + αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

n.s. = не значимо, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Лечебная комбинация ITF3756 (25 мг/кг) + средство, направленное против CTLA (10 мг/кг), в соответствии с настоящим изобретением, была более активной, чем введение отдельных лекарственных средств. Более того, указанная комбинация демонстрирует синергический терапевтический эффект.

Фактически, в день 24 комбинация лекарственных средств индуцировала 82% ингибирование (0,34 г и 1,89 г) опухолевого роста, тогда как ITF3756 и средство, направленное против CTLA4 по отдельности индуцировали 7% (1,76 и 1,89 г) и 57% ингибирование (0,82 и 1,89 г) соответственно.

Влияние ITF3756, введенного в дозе 50 мг/кг, в комбинации с наиболее высокой дозой антитела к CTLA4 (10 мг/кг), представлено на **фигуре 4**.

<i>Группа</i>	Статистическая значимость по сравнению с контрольной группой в день						
	10	12	14	17	19	21	24
ITF3756 50 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
αCTLA4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

10 мг/кг							
ITF3756 50 мг/кг + αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	***	***

n.s. = не значимо, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Лечебная комбинация ITF3756 (50 мг/кг) + средство, направленное против CTLA (10 мг/кг), была более активной, чем введение отдельных лекарственных средств. Более того, указанная комбинация демонстрирует синергический терапевтический эффект.

Фактически, в день 24 комбинация лекарственных средств индуцировала 83% ингибирование (0,32 и 1,89 г) опухолевого роста, тогда как ITF3756 и средство, направленное против CTLA4 по отдельности индуцировали 9% (1,72 и 1,89 г) и 57% ингибирование (0,82 и 1,89 г) соответственно.

Влияние ITF3756, введенного в дозе 50 мг/кг 3 раза в день, в комбинации с наиболее высокой дозой антитела к CTLA4 (10 мг/кг), представлено на **фигуре 5**.

<i>Группа</i>	Статистическая значимость по сравнению с контрольной группой в день						
	10	12	14	17	19	21	24
ITF3756 50 мг/кг x3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**
αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***
ITF3756 50 мг/кг x3 + αCTLA4 10 мг/кг	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***	***

n.s. = не значимо, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Лечебная комбинация ITF3756 (50 мг/кг x3) + средство, направленное против CTLA (10 мг/кг), была более активной, чем введение отдельного лекарственного средства. Более того, указанная комбинация демонстрирует синергический терапевтический эффект.

Фактически, в день 24 комбинация лекарственных средств индуцировала 89% (0,2 и 1,89 г) ингибирование опухолевого роста, тогда как ITF3756 и средство, направленное против CTLA4 по отдельности индуцировали 30% (1,32 и 1,89 г) и 57% ингибирование (0,82 и 1,89 г) соответственно. Более того, эффективность комбинированной обработки в день 24 приводила к значимо более высоким результатам, чем эффективность монотерапии антителом к CTLA4 ($p < 0,001$).

Поскольку рост опухолей у животных, обработанных обеими комбинациями лекарственных средств (средство, направленное против CTLA4, + ITF3756 50 мг/кг один раз в день и 3 раза в день), практически полностью прекращался в день 24 (последний экспериментальный день контрольной группы), введение лекарственного средства этим двум группам продлевали до дня 42.

Полученные результаты представлены на **фигуре 6**. На графике указан средний объем опухолей, которые поддавались измерению.

Обе комбинации лекарственных средств в соответствии с настоящим изобретением индуцировали однонаправленное и мощное ингибирование опухолевого роста до дня 35 включительно. С этого дня опухоли у животных, обработанных комбинацией ITF3756 один раз в день + средство, направленное против CTLA4, продолжают расти до дня 48, тогда как опухоли у животных, обработанных комбинацией ITF3756 три раза в день + средство, направленное против CTLA4, оставались неизменными до дня 42, а затем уменьшились в объемах.

Неожиданно в день 48 у 2 из 5 мышей в группе, обработанных комбинацией ITF3756 один раз в день + средство, направленное против CTLA4, и у 2 из 4 мышей в группе, обработанных комбинацией ITF3756 три раза в день + средство, направленное против CTLA4, опухоли отсутствовали.

Кроме того, мышам из двух групп комбинации лекарственных средств (средство, направленное против CTLA4, + ITF3756 50 мг/кг один раз в день и 3 раза в день) вводили вторую инъекцию опухоли (опухолевая стимуляция) для мониторинга роста вторичных опухолей.

Вторую инъекцию (1×10^6 клеток CT26/мышь s.c.) выполняли в левую паховую область в день 49 и животных оставляли без обработки до дня 73. В качестве контроля

оптимального роста клеток CT26, используемых для второй инъекции, в тот же день вводили инъекцию 5 интактным мышам.

Полученные результаты представлены на **фигуре 7**.

Клетки CT26, инъецированные в левый бок интактным животным (контрольная группа), характеризовались предполагаемым ростом.

Рост вторичных опухолей незначительно наблюдался (в день 63) у 3 из 5 мышей (№3, 5 и 6), обработанных комбинацией ITF3756 (50 мг/кг один раз в день) + средство, направленное против CTLA4 (10 мг/кг), как сообщалось на **фигуре 8 (А-В)**.

Следует отметить, что в этой группе (комбинация ITF3756 50 мг/кг один раз в день + средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг) вторичные опухоли развивались только у животных с опухолями в день 48, тогда как у животных без опухолей их рост не наблюдался (мыши №2 и 4).

Вторичные опухоли не развились ни у одной из мышей, обработанных комбинацией ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) + средство, направленное против CTLA4 (10 мг/кг), независимо от наличия (как у мыши №6) или отсутствия (как у мышей №2, 4 и 5) первичных опухолей в день 48, как показано на **фигуре 9 (А-В)**.

Выводы

Полученные результаты можно обобщить следующим образом:

1. ITF3756, вводимый в дозах 25 и 50 мг/кг один раз в день в комбинации с антителом к CTLA4, демонстрирует противоопухолевый эффект, превосходящий эффект введения отдельных лекарственных средств, и этот терапевтический эффект является синергическим.
2. Наиболее выраженный противоопухолевый эффект был получен при введении ITF3756 (50 мг/кг три раза в день) в комбинации со средством, направленным против CTLA4 (10 мг/кг).
3. Комбинации ITF3756 в дозе 50 мг/кг один раз в день или три раза в день со средством, направленным против CTLA4, в дозе 10 мг/кг вызывали значимую задержку

опухолевого роста, и через 73 дня обработки 2 из 5 и 4 из 4 мышей не содержали опухолей соответственно.

4. Вторичные опухоли не развивались (как в группе, обработанной комбинацией ITF3756 50 мг/кг три раза в день + средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг) или медленно развивались только у 3 из 5 мышей (как в группе, обработанной комбинацией ITF3756 50 мг/кг один раз в день + средство, направленное против CTLA4, 10 мг/кг). Поскольку и ITF3756, и средство, направленное против CTLA4, нуждаются в компетентной иммунной системе для проявления противоопухолевого эффекта, этот результат указывает на то, что у обработанных животных был индуцирован эффективный противоопухолевый иммунный ответ, т.е. ответ, который предупреждал рост вторичной опухоли.

ПРИМЕР 2

ВЛИЯНИЕ ITF3756 В КОМБИНАЦИИ СО СРЕДСТВОМ, НАПРАВЛЕННЫМ ПРОТИВ CTLA4, НА ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА ПО СРАВНЕНИЮ С КОМБИНАЦИЕЙ СРЕДСТВО, НАПРАВЛЕННОЕ ПРОТИВ PD-1, + СРЕДСТВО, НАПРАВЛЕННОЕ ПРОТИВ CTLA4

Самкам Balb/c в возрасте 6 недель вводили опухолевые клетки CT26.WT в правый бок. Через приблизительно 10 дней, при обнаружении опухолей, обработки начинали по следующей схеме.

- 1) Комбинация ITF3756 50 мг/кг перорально три раза в день (Q3x5) + α CTLA4 10 мг/кг ip 4 раза через день с последующим периодом отмывания в течение 6 дней (изобретение);
- 2) комбинация α PD1 3 мг/кг, ip, через два дня + α CTLA4 10 мг/кг ip 4 раза через день с последующим периодом отмывания в течение 6 дней (ссылка).

Всякий раз, когда опухолевые узлы обнаруживаются по меньшей мере у 80-85% животных, начинают обработки, а эксперимент прекращают, когда вес опухолей контрольной группы равен 10% веса тела животного или (конечная точка для человека)

какой-либо узел изъязвляется. Животных взвешивали два раза в неделю и опухоли измеряли три раза в неделю.

Размер опухолевого узла рассчитывают по следующей формуле: объем (мм³) = (D x d²)/2, где D = большой диаметр узла и d = малый диаметр узла.

Результаты, представленные на **фигуре 10**, показывают, что между двумя комбинированными обработками статистические различия в ингибировании опухолевого роста отсутствуют.

Комбинация ITF3756 плюс средство, направленное против CTLA4, в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется той же противоопухолевой активностью, что и одобренная комбинация средство, направленное против PD-1, + средство, направленное против CTLA4, используемая в качестве эталона.

ПРИМЕР 3

ВЛИЯНИЕ ITF3756 ОТДЕЛЬНО ИЛИ В КОМБИНАЦИИ СО СРЕДСТВОМ, НАПРАВЛЕННЫМ ПРОТИВ CTLA4, НА ДИАБЕТ У САМОК МЫШЕЙ NOD

У мышей NOD спонтанно развивался диабет, и они представляют собой широко принятую спонтанную модель сахарного диабета 1 типа (Pearson et al., 2016, Journal of Autoimmunity 66, 76-88).

Путь белка запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1) регулирует аутоиммунный диабет у мышей NOD. Блокада PD-1 или PD-L1 быстро, менее чем за неделю, провоцировала развитие диабета у самок мышей в возрасте 10 недель, находящихся в преддиабетическом состоянии (Ansari et al., 2003, The Journal of experimental medicine 198, 63-69).

Блокада оси PD-1/PD-L1 также является пагубной и в других аутоиммунных моделях. Например, мыши PD-1^{-/-} демонстрировали как повышенную заболеваемость, так и более высокую степень тяжести индуцированного коллагеном артрита (CIA), чем мыши дикого типа (Raptopoulou et al., 2010. Arthritis & Rheumatism 62, 1870-1880). PD-L1, экспрессируемый на макрофагах, защищает от CIA, а блокирование PD-L1 во время индуцированного коллагеном артрита приводит к более тяжелому артриту (Wood et al., 2020, The Journal of Immunology 204, 73.12). В модели рассеянного склероза вследствие

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) PD-1 играет решающую роль, а делеция PD-1 усугубляет течение патологии (Zhang and Braun, 2014, International Immunology 26, 407-415).

Ингибирование HDAC6 может приводить к снижению экспрессии PD-L1 в ряде типов клеток, подвергнутых различным стимулам, за счет чего оказывается влияние на ось PD-1/PD-L1 с потенциальной активацией иммунной системы.

Однако ингибирование HDAC6 является эффективным в моделях аутоиммунных патологий, таких как CIA и EAE. Кроме того, в наших исследованиях у мышей HDAC6 KO развивался EAE более слабой степени по сравнению с контрольной группой HDAC6 дикого типа, сопоставимой по возрасту и полу.

В совокупности эти данные указывают на то, что ингибирование HDAC6 в контексте аутоиммунных реакций является защитным, несмотря на широко описанную роль ингибиторов HDAC6 в подавлении экспрессии PD-L1.

Учитывая влияние HDAC6 на PD-L1, у авторов настоящего изобретения возник вопрос, может ли у мышей NOD, обработанных ITF3756, быстро индуцироваться диабет, как у мышей, обработанных средством, направленным против PD-(L)1, или вместо этого влияния на индукцию диабета не происходит.

Обработка мышей в возрасте 10-12 недель средством, направленным против CTLA-4, не оказывает влияния на индукцию диабета, однако авторы настоящего изобретения прогнозируют, что совместная обработка средством, направленным против PD-(L)1/средством, направленным против CTLA-4, приводит к сопоставимому эффекту монотерапии средством, направленным против PD-(L)1.

Гипотеза заключалась в том, что мыши NOD, обработанные селективным ингибитором HDAC6 ITF3756 отдельно или в комбинации со средством, направленным против CTLA-4, не характеризовались изменением течения диабета, или что был индуцирован лишь ограниченный эффект.

Способы и методы

ITF3756 (N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид)

ITF3756 синтезировали в отделе медицинской химии компании Italfarmaco SpA. ITF3756, серия 9, в виде порошка растворяли в DMSO и хранили при -20°C.

Идентификация	ITF3756, серия 9
Тип состава	Раствор в несущей среде
Концентрация дозы	5 мг/мл
Инструкция по приготовлению	Взвесьте соответствующее количество исследуемого соединения и приготовьте раствор в концентрации 100 мг/мл в DMSO. Разбавьте этот раствор смесью H ₂ O/PEG в соотношении 1:1 для достижения необходимой дозы исследуемого образца (раствор 5 мг/мл). Хранить при перемешивании магнитной мешалкой.
Частота приготовления	Исследуемые составы готовили в день введения дозы
Условия хранения	Комнатная температура
Источник и производитель	Italfarmaco SpA
Способ и путь введения	Перорально, через желудочный зонд, с использованием металлического желудочного зонда и градуированного пластикового шприца.
Продолжительность	5 дней подряд x 2 цикла (цикл 1: день 0-4; цикл 2: день 6-8,11)
Частота	3 x в день с интервалом 4 часа
Объем	10 мл/кг. Объем индивидуальной дозы рассчитывали на основе веса тела, зафиксированной в день введения дозы.

Антитела

Обработку антителами проводили в соответствии с Ansari (Ansari et al., 2003, The Journal of experimental medicine 198, 63-69)

Идентификация	Средство, направленное против PD-1 мыши
Номер партии/серии	735019O1 и 786520N1B

Тип состава	Фармацевтический препарат
Концентрации дозы	500 мкг (день 0)/200 мкл; 250 мкг (день 2, 4, 6, 8, 11)/200 мкл
Инструкция по приготовлению	Готовый к применению раствор в концентрации 7,7 мг/мл (партия 735019O1) или 8,31 мг/мл (партия 786520N1B). Затем разбавляли в PBS до получения целевых концентраций
Частота приготовления	Исследуемые составы готовили в день введения дозы
Условия хранения	+ 4°C, в защищенном от света месте
Источник и производитель	BioXCell

Идентификация	Средство, направленное против PD-L1 мыши
Номер партии/серии	720620A2
Тип состава	Фармацевтический препарат
Концентрации дозы	500 мкг (день 0)/200 мкл; 250 мкг (день 2, 4, 6, 8, 11)/200 мкл
Инструкция по приготовлению	Готовый к применению раствор в концентрации 8,29 мг/мл. Затем разбавляли в PBS до получения целевых концентраций
Частота приготовления	Исследуемые составы готовили в день введения дозы
Условия хранения	+ 4°C, в защищенном от света месте
Источник и производитель	BioXCell

Идентификация	Средство, направленное против CTLA-4 мыши
Номер партии/серии	755620A2

Тип состава	Фармацевтический препарат
Концентрации дозы	500 мкг (день 0)/200 мкл; 250 мкг (день 2, 4, 6, 8, 11)/200 мкл
Инструкция по приготовлению	Готовый к применению раствор в концентрации 8,35 мг/мл. Затем разбавляли в PBS до получения целевых концентраций
Частота приготовления	Исследуемые составы готовили в день введения дозы
Условия хранения	+ 4°C, в защищенном от света месте
Источник и производитель	BioXCell

Идентификация	Изотипический контроль IgG2b крысы
Номер партии/серии	707119D1
Тип состава	Фармацевтический препарат
Концентрации дозы	500 мкг (день 0)/200 мкл; 250 мкг (день 2, 4, 6, 8, 11)/200 мкл
Инструкция по приготовлению	Готовый к применению раствор в концентрации 9,16 мг/мл. Затем разбавляли в PBS до получения целевых концентраций
Частота приготовления	Исследуемые составы готовили в день введения дозы
Условия хранения	+ 4°C, в защищенном от света месте
Источник и производитель	BioXCell

Животные

Вид/штамм или порода	Самки мышей NOD (диабет без ожирения)
Источник	Charles River Laboratories, Italia S.p.A. Via Indipendenza 11, Calco (Италия)
Возраст	Примерно 11-12 недель в начале периода лечения (преддиабетическая фаза у самок мышей с диабетом без ожирения)
Вес	Диапазон: 19-27 грамм в день 0
Акклиматизация	По меньшей мере 4 дня

Критерии отбора	Животных рандомизировали на основании возраста в неделях, веса тела и клинических наблюдений
Идентификация	Металлические бирки с номером на правом ухе
Животных в исследовании	90 самок
Интактные по отношению к статусу экспериментальной процедуры	Да
Судьба животного	В конце исследования животных умерщвляют

Мышей NOD обрабатывали по следующей схеме:

Исследуемая группа	Исследуемый препарат	Доза препарата	Путь	Объем	Частота	Количество животных
1	Контрольные/интактные	-	-	-	-	10
2	Несущий контроль ^b + изотипический контроль	500 (d0)+250 мкг/мышь	OS IP	10 мл/кг 200 мкл/мышь	3х/день ^a (день 0-4,6-8,11) ^c День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
3	ITF3756	50 мг/кг	OS	10 мл/кг	3х/день ^a (день 0-4,6-8,11) ^c	10
4	Средство, направленное против PD-1	500 (d0)+250 мкг/мышь	IP	200 мкл/мышь	День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10

Исследуемая группа	Исследуемый препарат	Доза препарата	Путь	Объем	Частота	Количество животных
5	Средство, направленное против PD-L1	500 (d0)+250 мкг/мышь	IP	200 мкл/мышь	День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
6	Средство, направленное против CTLA-4	500 (d0)+250 мкг/мышь	IP	200 мкл/мышь	День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
7	ITF3756 + средство, направленное против CTLA-4	50 мг/кг 500 (d0)+250 мкг/мышь	OS IP	10 мл/кг IP	3х/день ^а (день 0-4,6-8,11) ^с День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
8	Средство, направленное против PD1 + средство, направленное против CTLA-4	500 (d0)+250 мкг/мышь	IP IP	200 мкл/мышь 200 мкл/мышь	День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10
9	Средство, направленное против PD-L1 + средство, направленное против CTLA-4	500 (d0)+250 мкг/мышь	IP IP	200 мкл/мышь 200 мкл/мышь	День 0, 2, 4, 6, 8, 11	10

Исследуемая группа	Исследуемый препарат	Доза препарата	Путь	Объем	Частота	Количество животных
<p>a = вторая и третья суточные дозы через приблизительно 4 часа после предыдущего введения</p> <p>b= PEG 400/H₂O (1:1), содержащий DMSO (макс. 5%)</p> <p>c= цикл 1: день 0-4; цикл 2: день 6-8, 11</p>						

Измерение уровня глюкозы

Гликемию измеряли у всех мышей в течение 3 недель с дня 0 (начало обработки) до дня 21 (конец исследования). Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометром OneTouch® Verio. Образцы крови брали из хвостовой вены с помощью укола иглой. Каплю крови вводили в тест-полоску, и глюкометр автоматически определял уровень глюкозы. Результаты отображались на дисплее прибора. Прибор измеряет в диапазоне от 20 до 600 мг/дл. Результаты ниже 20 или выше 600 мг/дл визуализируются прибором как «ниже 20» или «выше 600».

Диабет определяют при соблюдении уровня глюкозы в крови ≥ 250 мг/дл в течение двух дней подряд.

За мышами наблюдали в течение 3 недель; за это время вес тела измеряли 7 раз.

Результаты

Обработки IC1 способствовали проявлению внутренней возможности генерировать аутоиммунные ответы, что подтверждено клинической практикой. Комбинация двух IC1, таких как средство, направленное против CTLA4, и средство, направленное против PD-1, характеризуется более высокой эффективностью и более высокой частотой нежелательных явлений. Таким образом, целью иммунотерапии опухолей является повышение эффективности и снижение побочных эффектов до контролируемого уровня. Комбинация селективного ингибитора HDAC6 ITF3756 со средством, направленным против CTLA4, характеризуется противоопухолевой эффективностью, сопоставимой с комбинацией средство, направленное против CTLA4, + средство, направленное против PD-1, и данные на мышах NOD демонстрируют, что она характеризуется отличным профилем безопасности.

Результаты, полученные в модели NOD, показывают стремительную индукцию диабета у мышей, обработанных средством, направленным против PD-L1, и комбинацией (средство, направленное против PD-L1, + средство, направленное против CTLA-4). Эти выводы согласуются с литературными данными и прогнозами авторов изобретения соответственно (**фигура 11**).

Двумя другими группами, в которых наблюдали повышение заболеваемости диабетом, были группы обработки средством, направленным против PD-1, и комбинацией средство, направленное против PD-1, + средство, направленное против CTLA-4, с заболеваемостью диабетом 60% и 50% в день 21 соответственно.

В отличие от этого, только у одной мыши в группе (ITF3756 + средство, направленное против CTLA-4) наблюдали временное повышение уровня глюкозы между днем 11 и 14. Однако указанная мышь частично выздоровела, поскольку все показатели после дня 15 составляли ниже 250 мг/дл, хотя и выше, чем среднее значение в контрольной группе.

В других группах индукции диабета не обнаружено.

Результаты, полученные в группах, обработанных антителами, согласуются с литературными данными, которые описывают критическую роль оси PD-1/PD-L1 у мышей NOD.

Результаты явно показывают, что ингибирование HDAC6 не приводит к повышению заболеваемости диабетом, и, в частности, что комбинация селективного ингибитора HDAC6 ITF3756 с антителом к CTLA-4 оказывает очень незначительное влияние на индукцию диабета.

С другой стороны, комбинация антитела к CTLA-4 с антителами как к PD-1, так и к PD-L1 значительно усугубляет диабет.

Эти результаты позволяют предположить, что обработка комбинацией средство, направленное против CTLA-4, + средство, направленное против ITF3756 может характеризоваться лучшим профилем безопасности, чем обработка комбинацией средство, направленное против CTLA-4, + средство, направленное против PD-(L)1.

ПРИМЕР 4

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТ ИТF3756, ВВОДИМОГО В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛОМ К СТLА4 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 4Т1

Использовали мышей C57BL/6, стимулированных сингенной опухолевой клеточной линией 4Т1 трижды негативного рака молочной железы.

Модель опухоли 4Т1 считается слабоиммуногенной опухолью (Demaria et al., Clin. Cancer Res. 11, 728–734, 2005). В соответствии с предыдущими экспериментами, обработка этой опухоли средством, направленным против СТLА-4, демонстрирует общую эффективность, но изменчивость среди обработанных животных, и поэтому 4Т1 представляет собой приемлемую модель для исследования комбинированных видов терапии на основе иммунотерапии.

ИТF3756 используется в той же дозировке, что и для лечения рака толстой кишки СТ26, а именно 50 мг/кг (mpk) TID в день в качестве монотерапевтического средства и в комбинации с антителом к СТLА-4. Последнее вводят по 3 mpk 3 раза в неделю через день. В предыдущих экспериментах авторы настоящего изобретения наблюдали сопоставимое среднее снижение опухолевого роста на примерно 40% для обоих лекарственных средств. Средство, направленное против СТLА-4, приводило к сопоставимому уменьшению опухоли в дозе 3 mpk и 10 mpk, в то время как активность при 1 mpk была незначительной.

Опухолевый рост индуцируется после подкожной инъекции клеточной линии, и за мышами наблюдают в течение по меньшей мере трех недель после инъекции.

ПРИМЕР 5

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТ ИТF3756, ВВОДИМОГО В КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛОМ К СТLА4 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ МЕЛАНОМЫ В16F10

Использовали мышей C57BL/6, стимулированных сингенной опухолевой клеточной линией меланомы В16F10.

Модель меланомы В16F10 также считается слабоиммуногенной опухолью (Reilley et al., J. Immunother. Cancer 7, 323, 2019) и, следовательно, представляют собой еще одну приемлемую модель для исследования комбинаций на основе иммунотерапии.

ITF3756 используется в той же дозировке, что и для лечения рака толстой кишки CT26, а именно 50 мг/кг (mpk) TID в день в качестве монотерапевтического средства и в комбинации с антителом к CTLA-4.

Касательно дозы антитела к CTLA-4 в этой модели, авторы настоящего изобретения проводили предварительный эксперимент для определения оптимальной дозы, которую можно комбинировать с ITF3756. В соответствии с литературными данными, антитело к CTLA-4 вводят в разных дозах: дозу 200 мкг/мышь в день 3, а затем 100 мкг/мышь в день 6, 9 и 12 после инъекции опухолевых клеток (Reilley et al., 2019; Sharma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116, 10453–10462, 2019) использовали в качестве ориентира для этого эксперимента.

Опухолевый рост индуцируется после подкожной инъекции клеточной линии, и за мышами наблюдают в течение по меньшей мере трех недель после инъекции.

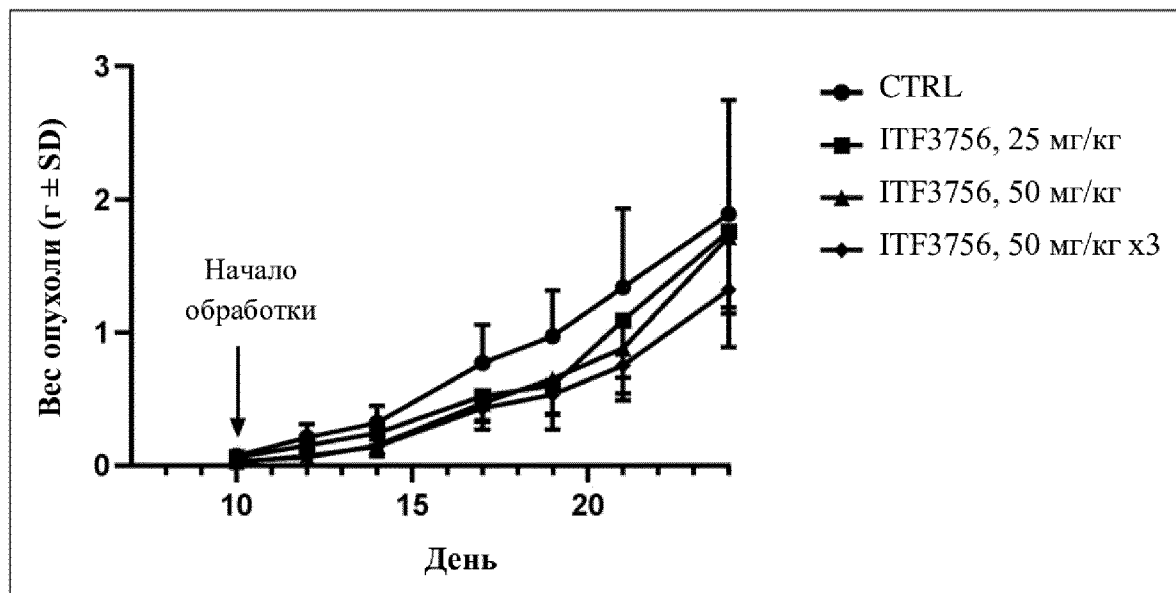
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация, содержащая N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4.
2. Комбинация по п. 1, характеризующаяся тем, что указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 представляет собой ипилимумаб или тремелимумаб.
3. Комбинация по п. 1 или п. 2 для применения в качестве лекарственного препарата.
4. Комбинация для применения по п. 3 для лечения любого заболевания или состояния, при котором возможно обеспечить улучшение или предупреждение с помощью лечения антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PD-L1.
5. Комбинация для применения по п. 3 или п. 4 для лечения пациента, который прекратил лечение антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1.
6. Комбинация для применения по любому из пп. 3-5 для иммунотерапии опухолей или для лечения одного или более опосредованных HDAC6 заболеваний.
7. Комбинация для применения по п. 6 для лечения пациента, которого не лечили антителами к CTLA4, антителами к PD1 и/или антителами к PDL1.
8. Комбинация для применения по п. 6 или п. 7 для лечения одного или более заболеваний, выбранных из группы, состоящей из меланомы, рака молочной железы, почечно-клеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого и колоректального рака.
9. Комбинация для применения по любому из пп. 3-8, характеризующаяся тем, что N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид или его фармацевтически приемлемая соль и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 предназначены для одновременного, отдельного или последовательного введения.
10. Комбинация для применения по п. 9, характеризующаяся тем, что N-гидрокси-4-

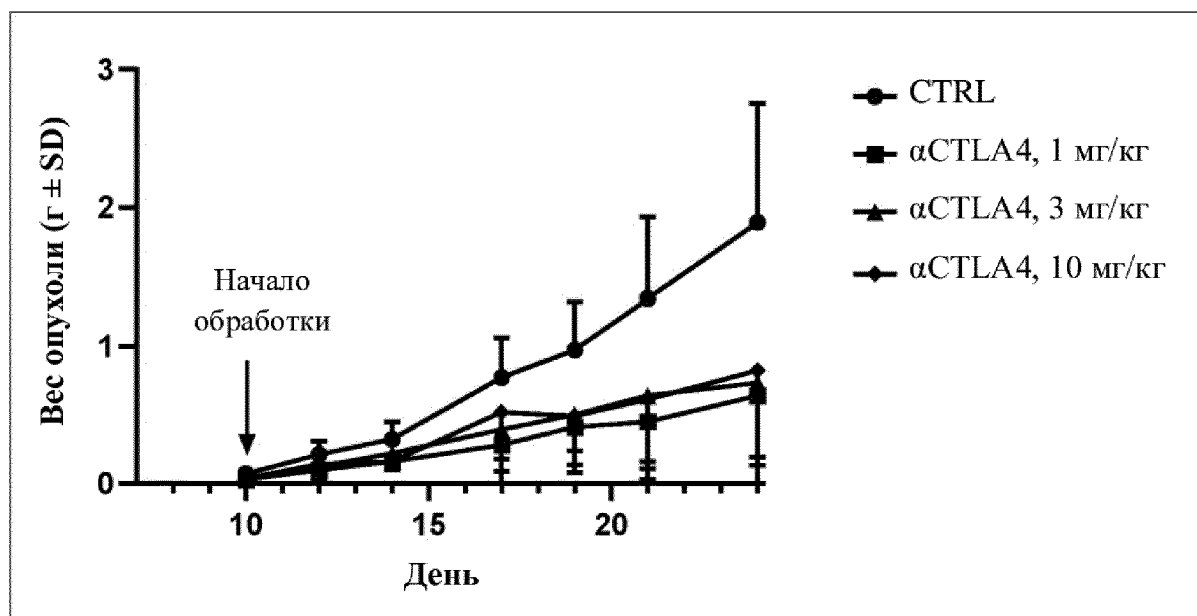
((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид вводится пациенту ежедневно, предпочтительно от 2 до трех раз в день, более предпочтительно пероральным путем, и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 вводится пациенту каждые 2-4 недели, предпочтительно с помощью внутривенной инфузии.

11. Комбинация для применения по п. 9 или п. 10, характеризующаяся тем, что N-гидрокси-4-((5-(тиофен-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)бензамид вводится пациенту в количестве от 200 мг до 1000 мг BID или от 100 мг до 1000 мг TID, и указанный по меньшей мере один ингибитор контрольной точки CTLA4 вводится пациенту в количестве от 0,5 до 10 мг/кг каждые 2-4 недели, предпочтительно от 1 до 3 мг/кг каждые 2-4 недели.

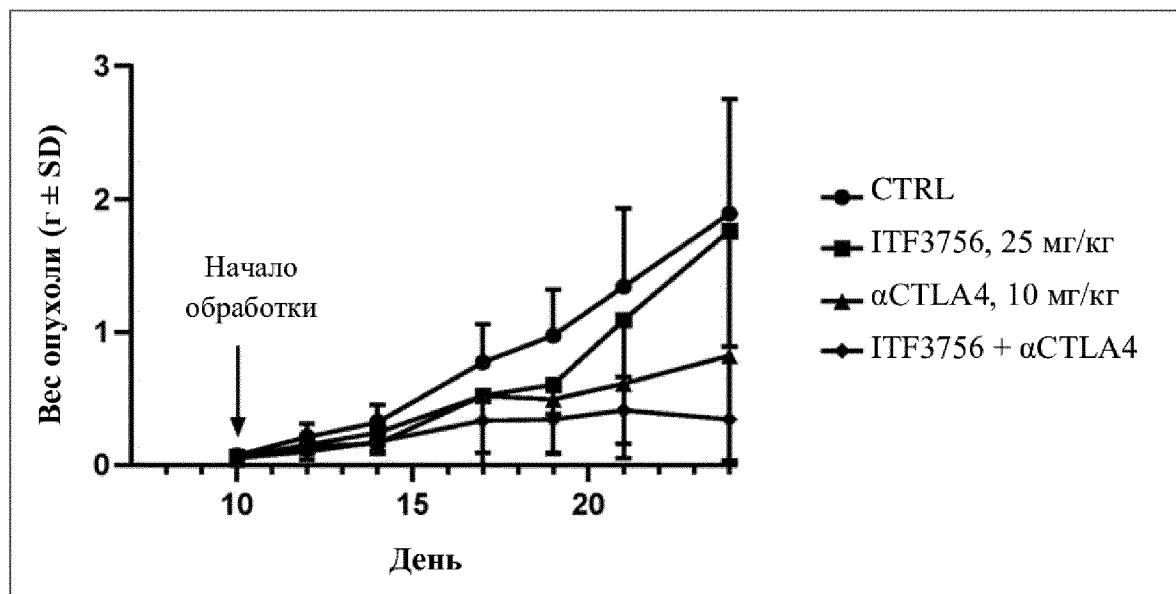
Фигура 1



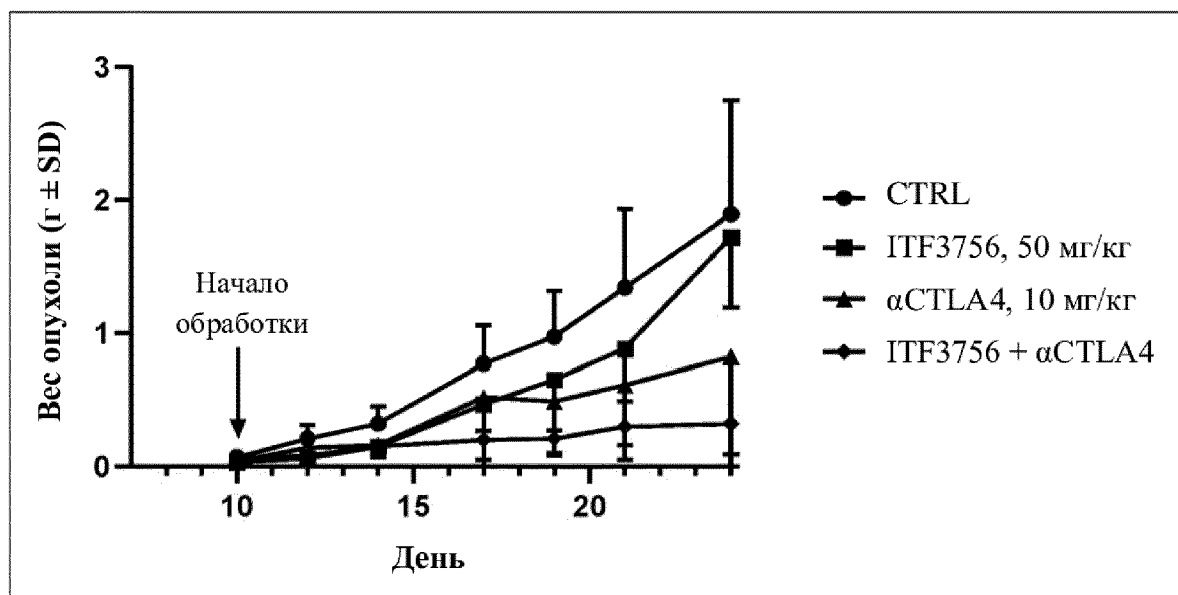
Фигура 2



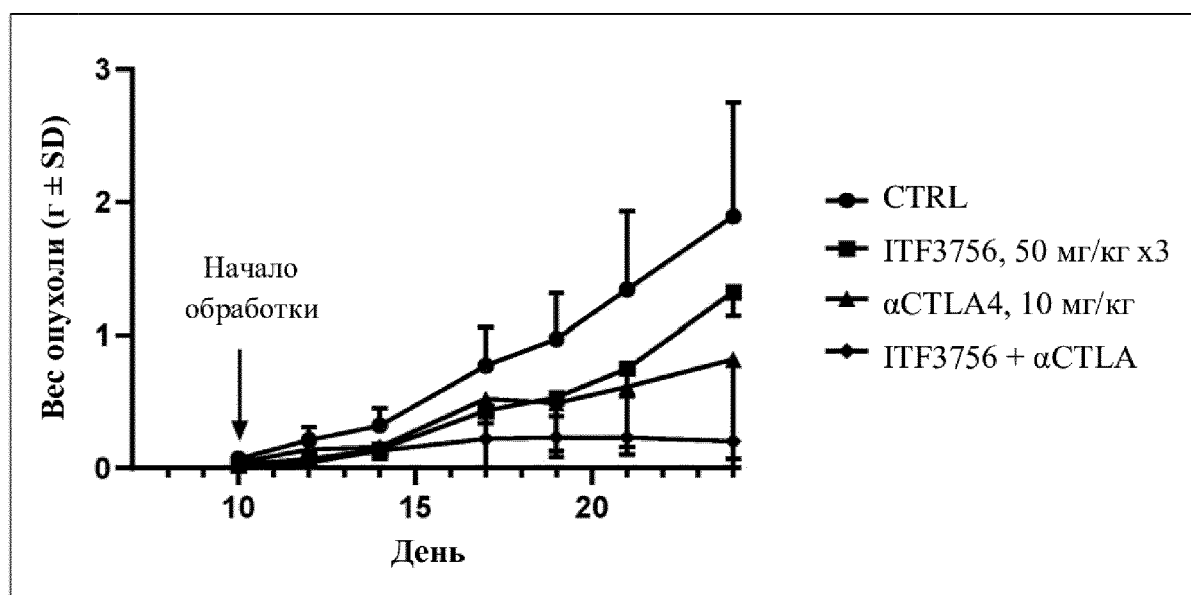
Фигура 3



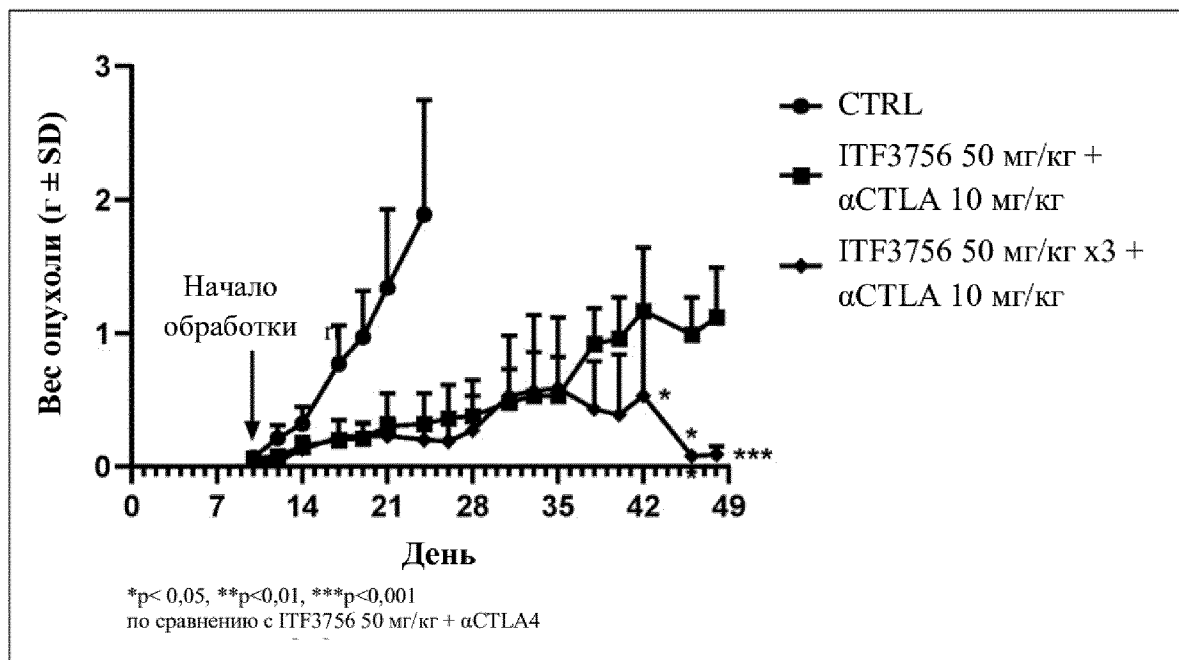
Фигура 4



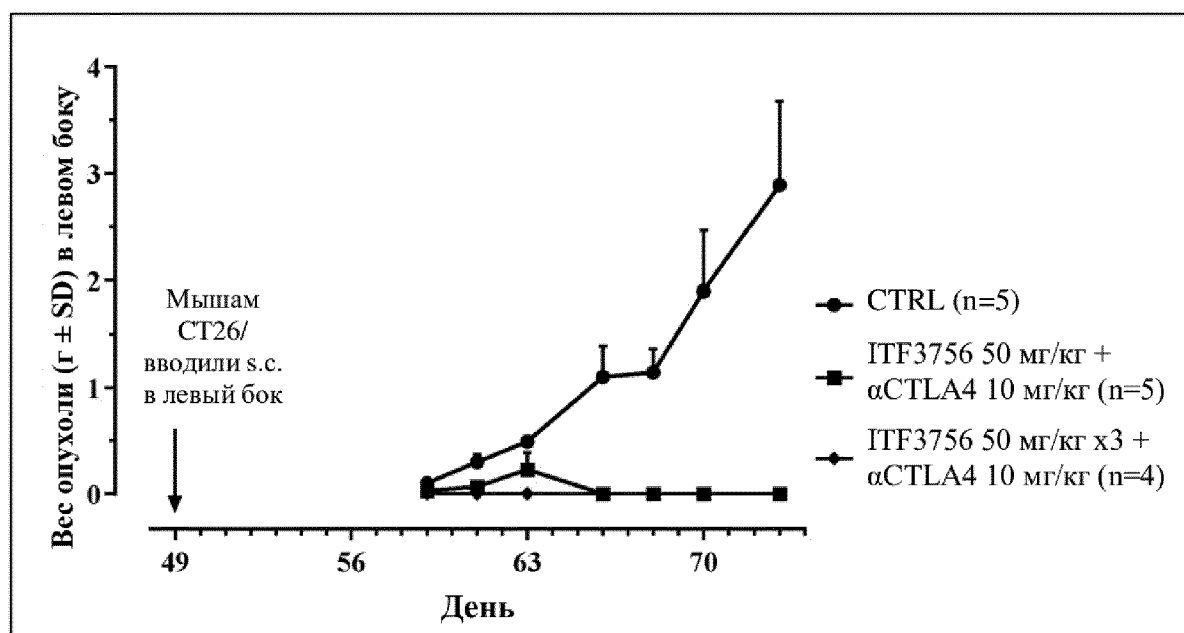
Фигура 5



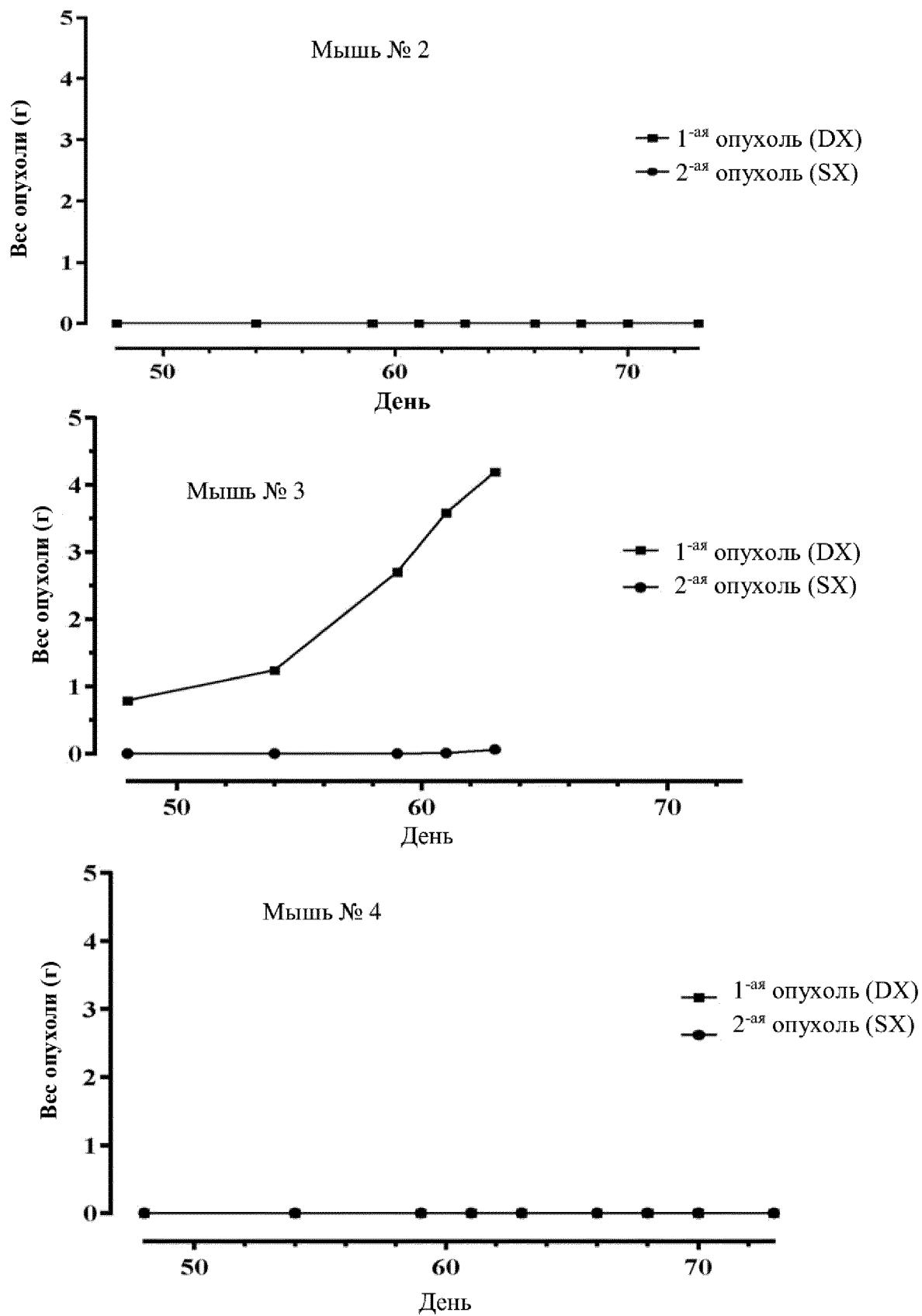
Фигура 6



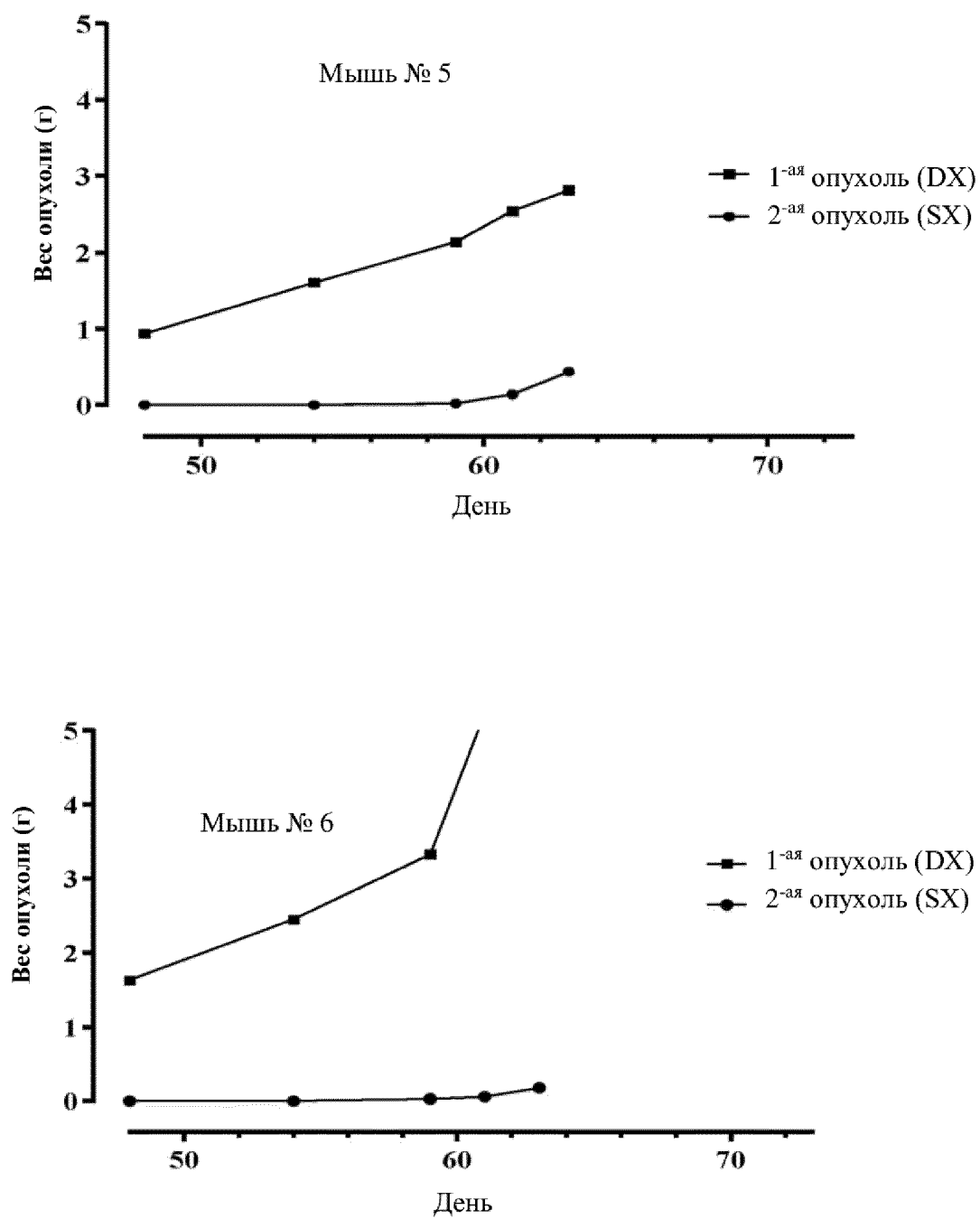
Фигура 7



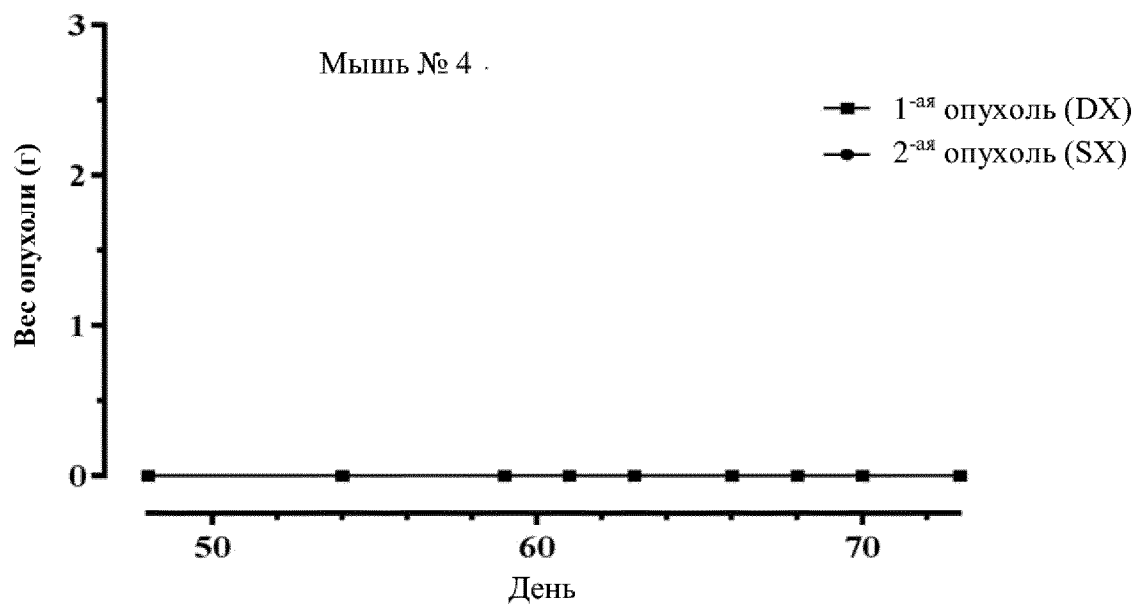
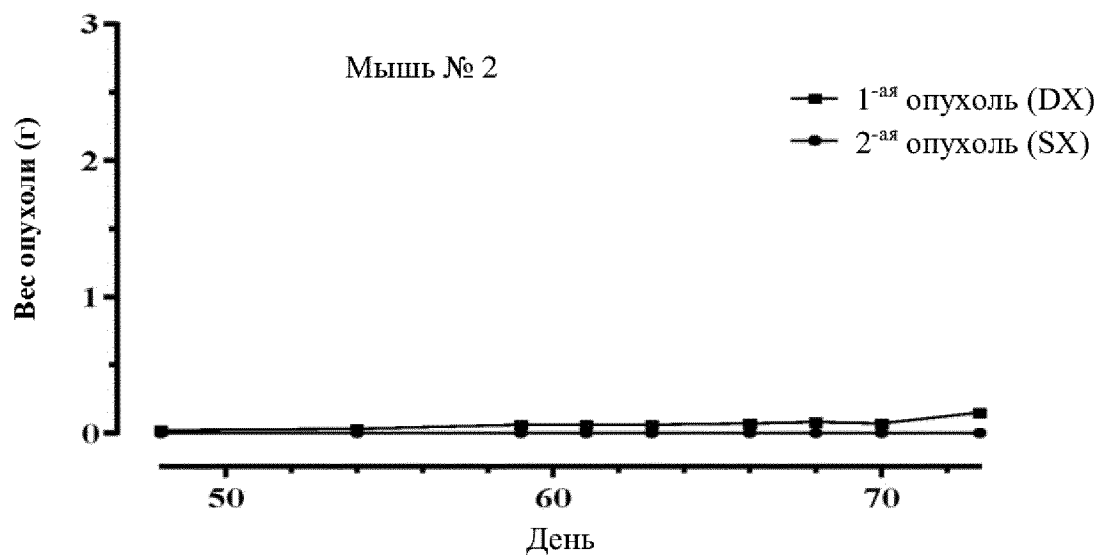
Фигура 8А



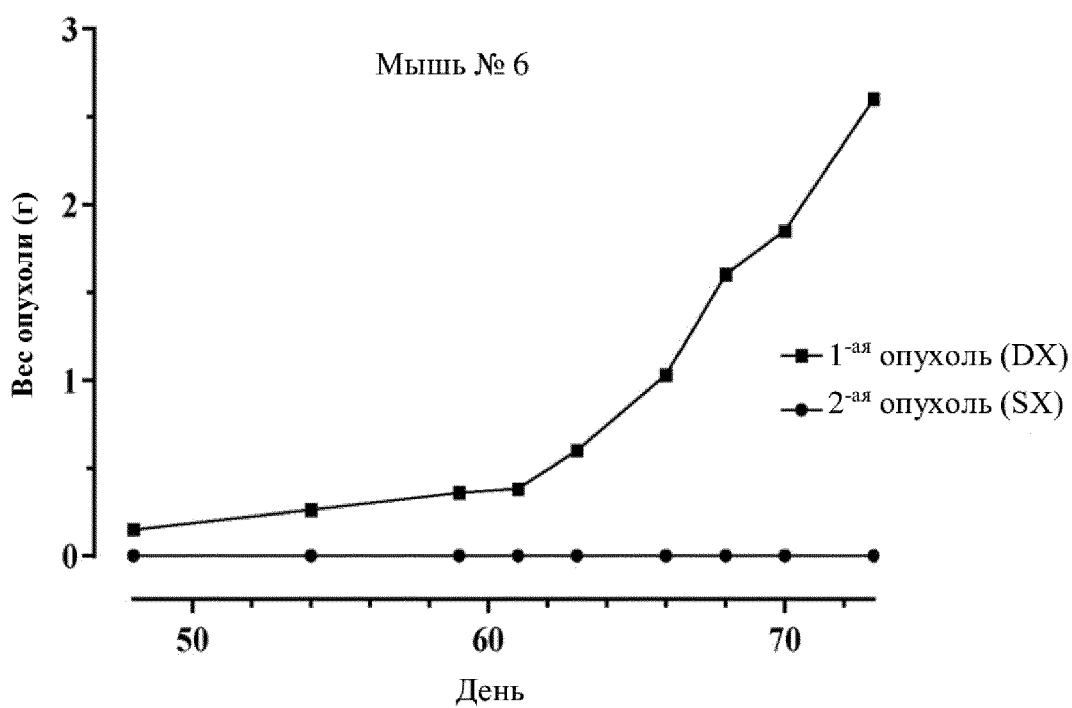
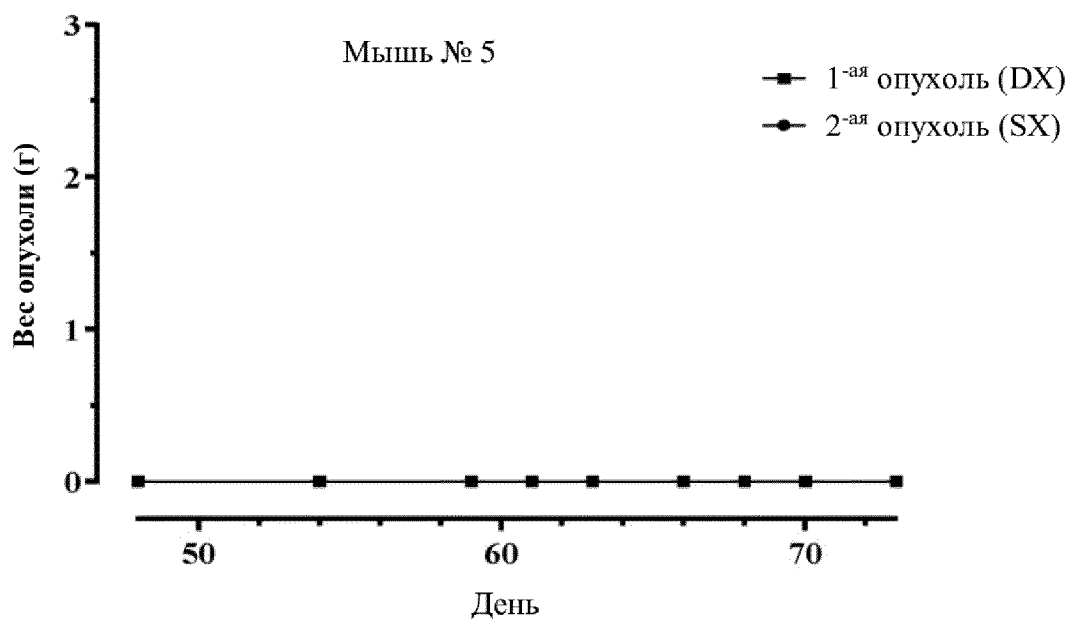
Фигура 8В



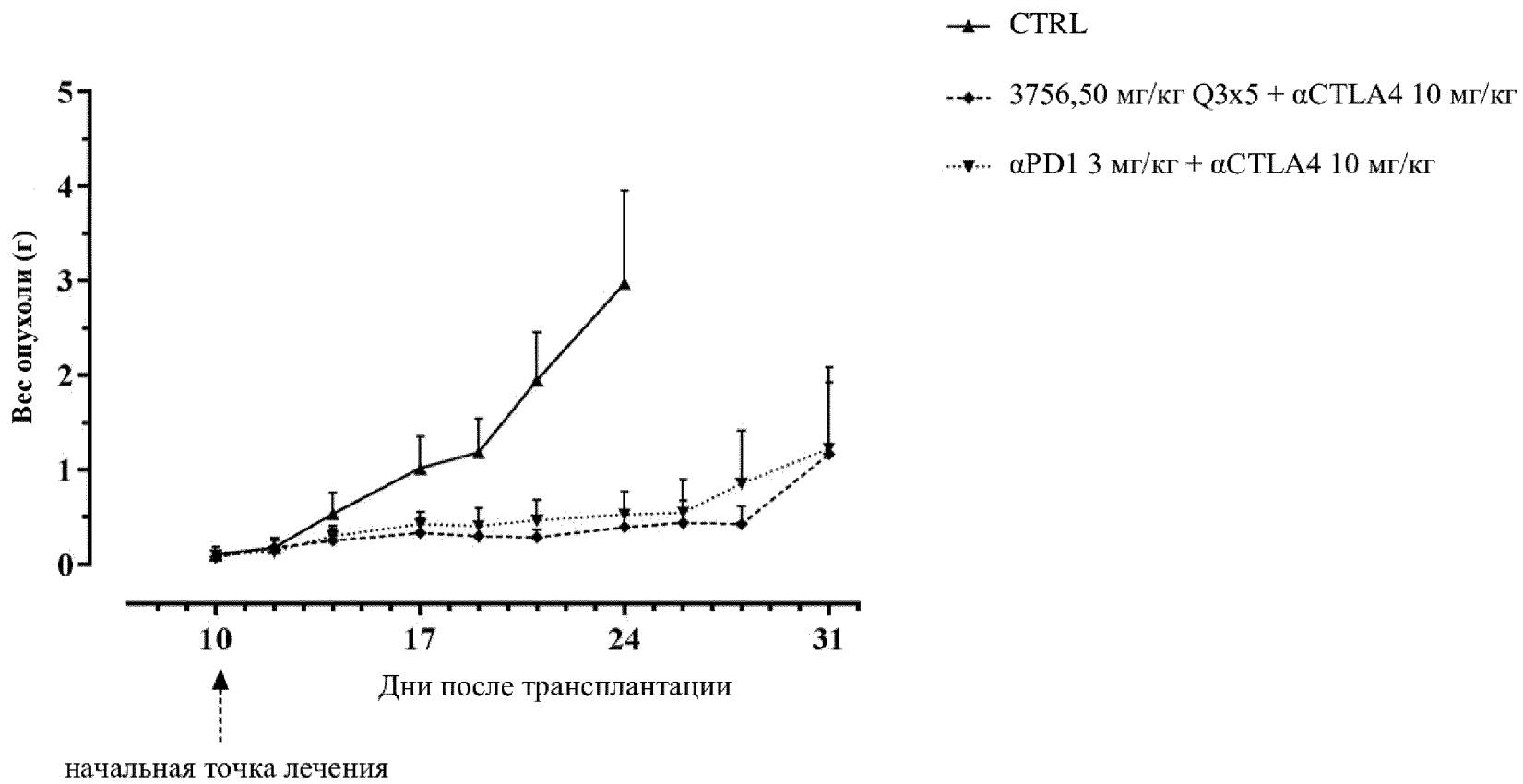
Фигура 9А



Фигура 9В



Фигура 10



Фигура 11

