УКРАЇНА

(19) UA (11) 130947 (13) C2

(51) МПК (2026.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2022 03136**

(22) Дата подання заявки: **26.01.2021**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **25.06.2026**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/967,517, 63/040,941, 63/125,630**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **29.01.2020, 18.06.2020, 15.12.2020**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **01.11.2023, Бюл.№ 44**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **24.06.2026, Бюл.№ 25**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/US2021/015124, 26.01.2021**

(72) Винахідник(и):
Ґрінштейн Ендрю (US),
Ґрауер Андреас (US),
Шеперд Стейсі (US)

(73) Володілець (володільці):
КОРСЕПТ ТЕРАПЬЮТІКС ІНКОРПОРЕЙТЕД,
101 Redwood Shores Parkway Redwood City, California USA 94065 (US)

(74) Представник:
Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25

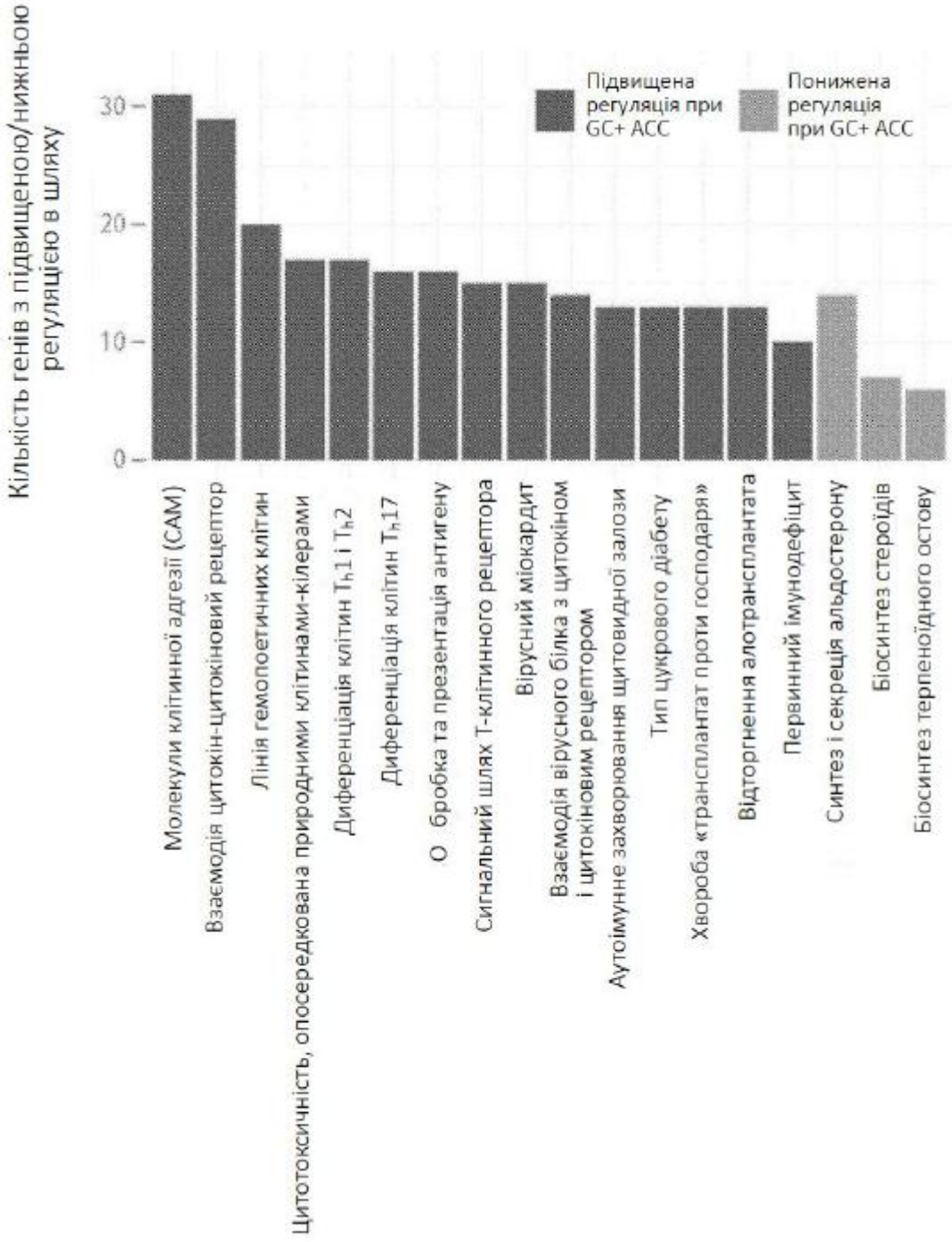
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 20190083486 A1, 21.03.2019
HABRA MOUHAMMED AMIR et al. Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma. JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER. 18.09.2019. Vol. 7. No. 1. P. 1-9
PEPPA MELPOMENI et al. Adrenocortical carcinoma secreting cortisol, androgens and aldosterone: a case report. CASES JOURNAL, BIOMED CENTRAL LTD. 10.09.2009. Vol. 2. No. 1, P. 8951
TACON LYNDAL J. et al. The Glucocorticoid Receptor Is Overexpressed in Malignant Adrenocortical Tumors. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY. 01.11.2009. Vol. 94. No. 11. P. 4591-4599
HAZEL J. HUNT et al. Identification of the Clinical Candidate (R)-(1-(4-Fluorophenyl)-6-((1-methyl-1 H -pyrazol-4-yl)sulfonyl)-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-1 H -pyrazolo[3,4- g]isoquinolin-4a-yl)(4-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)methanone (CORT125134): A Selective Glucocorticoid Receptor (GR) Antagonist. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. 27.04.2017. Vol. 60. No. 8. P. 3405-3421
LEHMANN T. et al. The molecular basis of adrenocortical cancer. CANCER GENETICS. 21.02.2012. Vol. 205. No. 4. P.131-137
US 7678813 B2, 16.03.2010

(54) ЛІКУВАННЯ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ СЕЛЕКТИВНИМИ МОДУЛЯТОРАМИ ГЛЮКОКОРТИКОЇДНИХ РЕЦЕПТОРІВ (SGRM) ТА ІНГІБІТОРАМИ КОНТРОЛЬНИХ ТОЧОК АНТИТІЛ

(57) Реферат:

UA 130947 C2

Винахід стосується комбінації 1) селективного модулятора глюкокортикоїдного рецептора (SGRM), що є релакорилантом, або SGRM CORT125281 та 2) інгібітора контрольної точки антитіла, вибраного з антитіла, ефективного проти PD-1, антитіла, ефективного проти CTLA-4, антитіла, ефективного проти PD-L1, та антитіла, ефективного проти PD-L2,
для лікування пухлини адренокортикальної карциноми у пацієнта, який страждає на ACC та має надлишок кортизолу.



Фіг. 1

Передумови створення винаходу

[0001] Надниркові залози є природним джерелом глюкокортикоїду (GC) кортизолу. Кортизол виробляється і виділяється надниркoвими залозами у відповідь на адренокортикотропний гормон (ACTH), який виділяється гіпофізом. Рівень кортизолу змінюється протягом дня і ночі, його можна виміряти в крові (наприклад, у сироватці, плазмі або цільній крові), а також вранці (коли рівень кортизолу зазвичай є найвищим). Рівень кортизолу також можна виміряти в сечі (наприклад, вимірювання кортизолу в сечі за 24 год., може забезпечити вимірювання кортизолу, на який менше впливає час доби, коли проводився відбір), слині (наприклад, кортизол у слині пізно вночі, коли рівень кортизолу, як правило, найнижчий) і інших рідинах організму (наприклад, сльози і піт). Рівень кортизолу можна також виміряти після тесту на пригнічення дексаметазону, в якому кортизол забезпечує вимірювання відповіді осі гіпоталамус-гіпофіз-надниркові залози на глюкокортикоїди, які вводяться зовнішньо, такі як-от дексаметазон.

[0002] Підвищена глюкокортикоїдна (GC) активність, наприклад "надлишок кортизолу" або "надлишковий кортизол", незважаючи на те, що його важко точно визначити, використовується у патофізіології багатьох типів раку. Приблизно у половини пацієнтів з адренокортикальною карциномою (ACC) виявляються явні клінічні і біохімічні ознаки системного надлишку GC (GC+), що є унікальним тестом для оцінки корелятів активності GC. Широкий імуносупресивний ефект GC може обмежити імунну відповідь пухлини і ефективність інгібітора імунної контрольної точки (ICI).

[0003] Ефективність інгібіторів контрольних точок антитіл обмежена при адренокортикальній карценомі (ACC). Приблизно у половини хворих на ACC спостерігається системний надлишок кортизолу (GC+). Надлишок кортизолу викликає синдром Кушинга і інші розлади. Крім того, кортизол має імуносупресивну дію. Пригнічення імунітету пов'язане зі слабкою відповіддю на інгібітори контрольних точок. Специфічні імуносупресивні ефекти кортизолу при ACC невідомі. Також невідомі і імунні ефекти SGRM при GC+ACC.

[0004] В цій галузі існує потреба в забезпеченні більш ефективних методів лікування ACC, включаючи потребу в посиленні ефектів лікування інгібіторами контрольних точок антитіл для пацієнтів, які страждають від ACC.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Була проаналізована [0005] мультиоміка адренокортикальної карциноми (ACC) для визначення молекулярних наслідків активності глюкокортикоїдів (GC) і оцінки обґрунтування поєднання релакориланту, антагоніста глюкокортикоїдних рецепторів (GR), з інгібітором імунних контрольних точок (ICI) в адренокортикальній карциномі з глюкокортикоїдним надлишком (GC+ACC). Заявник проаналізував загальнодоступні дані про транскрипцію гена пухлини ACC і GC надлишку (наприклад, надлишку кортизолу).

[0006] Методи лікування включають введення селективного модулятора глюкокортикоїдних рецепторів (SGRM) і інгібітора контрольних точок антитіл пацієнту, який страждає на адренокортикальну карциному (ACC) і має надлишок кортизолу. У пацієнта спостерігається надлишок кортизолу, якщо рівень кортизолу у нього перевищує нормальний діапазон, наприклад, перевищує верхню межу нормального кортизолу. У варіантах застосування надлишок кортизолу ідентифікується, коли рівні кортизолу пацієнта дорівнює або перевищують приблизно у півтори (1,5) рази нормальний рівень кортизолу, або дорівнює або перевищує приблизно удвічі (2) нормальний рівень кортизолу. У варіантах застосування надлишок кортизолу визначається там, де спостерігається нетипове підвищення добового ритму кортизолу у пацієнта.

[0007] Наслідки надлишку кортизолу можуть включати, наприклад, посилення впливу кортизолу на імунні відповіді в пухлині і на пухлину (наприклад, пригнічення імунітету в пухлині, лімфатичних вузлах тощо). У варіантах застосування введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіл може бути ефективним для зменшення або усунення ефектів надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу і може бути ефективним для зменшення навантаження пухлини ACC у пацієнта. У варіантах застосування введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіл може бути ефективним для зменшення або усунення ефектів надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу і може бути ефективним для відновлення Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK) сигнальних шляхів у пацієнта. У варіантах застосування введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіл може бути ефективним для зменшення або усунення ефектів надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу і може бути ефективним для збільшення Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK) інфільтрації в пухлину ACC у пацієнта. У варіантах застосування введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіл може бути ефективним для

зменшення або усунення ефектів надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу і може бути ефективним для зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта.

[0008] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) є нестероїдною сполукою, яка містить конденсовану структуру азадекаліну, в якій конденсована структура азадекаліну описана і розкрита в патентах US 7,928,237 і в патенті US 8,461,172, повний зміст обох патентів повністю включений в цей опис шляхом посилання.

[0009] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) є нестероїдною сполукою, яка містить гетероарил кетонову конденсовану структуру азадекаліну, причому гетероарил кетонова конденсована структура азадекаліну, описана і розкрита в патенті US 8,859,774, повний вміст якого включений в цей опис шляхом посилання.

[0010] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) є нестероїдною сполукою, яка містить октагідро конденсовану структуру азадекаліну, причому структура октагідро конденсованого азадекаліну є такою, яка описана і розкрита в патенті US 10 047 082, повний вміст якого включений в цей опис шляхом посилання…

[0011] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM, такий як нестероїдний SGRM) вводять перорально.

[0012] Ці способи забезпечують покращені способи лікування адренокортикальної карциноми (ACC). Вважається, що способи, розкриті в цьому документі, забезпечують терапевтичні переваги для пацієнтів, які страждають на ACC, причому ці терапевтичні переваги включають, наприклад, зменшення навантаження на пухлину ACC; відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і клітин природних кілерів (NK); збільшення Т-клітинної і NK-клітинної інфільтрації в пухлину ACC; зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта; та інші терапевтичні переваги.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

[0013] Фіг. 1 показує відмінності в шляхах транскрипції у випадках GC+ACC ("GC+" вказує на пацієнтів з ACC, у яких спостерігається надлишок GC). Понижена регуляція відноситься до шляхів, нижчих у випадках GC+ACC, тоді як підвищена регуляція стосується шляхів, підвищених у випадках GC+ACC.

[0014] Фіг. 2 показує велику кількість специфічних типів імунних клітин в пухлинах ACC. Кількість лімфоцитів була нижчою (ліворуч), тоді як кількість мезенхімальних стовбурових клітин і нейтрофілів була вищою (праворуч) у випадках GC+.

[0015] Фіг. 3A. Класифікація пухлин ACC за гормональним статусом. Серед 4 проведених порівнянь наявність або відсутність надлишку GC (GC+/-) була пов'язана з найбільшою кількістю суттєво різних генів в ACC (де "GC-" вказує на пацієнтів з ACC, у яких не спостерігається надлишку GC).

[0016] Фіг. 3B Транскрипційні ефекти надлишку GC. Було виявлено, що надлишок GC значно впливає на експресію 858 генів. Гени з вищою експресією у випадках GC+ (P≤0,05 і >2-кратна зміна експресії порівняно з GC-) показані праворуч. Ті випадки в яких нижча експресія у випадках GC+ показані ліворуч.

[0017] Фіг. 4. Вплив GC на метилювання промотора. Більша кількість генів була значно гіпометильована (P≤0,05, Δ бета <-0,2), ніж гіперметильована (P≤0,05, Δ бета>-0,2) в пухлинах GC+. Значення бета представляють відсоток метилювання в гені.

[0018] Фіг. 5. Неконтрольована кластеризація нормалізованої експресії генів для 2 шляхів KEGG. Показані шляхи включають сигналізацію Т-клітинних рецепторів і цитотоксичність, опосередковану природними клітинами-кілерами. Два верхніх рядки вказують на GC і загальний гормональний статус для кожної пухлини (чорний: GC+/H+, білий: GC-/H-), відтінки синього/червоного (показані в градаціях сірого) показують нормалізовану експресію генів для кожної пухлини, при цьому більш темно-синій колір відповідає нижчій експресії. При кластеризації за експресією генів випадки GC+ з'являються праворуч від фігури, де багато генів демонструють нижчу експресію. ("H+" вказує на наявність гормону, а "H-" вказує на відсутність гормону.)

[0019] Фіг. 6. Контрольована кластеризація нормалізованої експресії генів для 2 шляхів KEGG, показаних на Фіг. 5. У випадках GC+ (кластер праворуч) в цих шляхах домінує нижча експресія генів (темно-синій).

[0020] Фіг. 7. Підвищення навантаження мутації пухлини в GC+ACC. У випадках GC+ спостерігалося більше міссенс- і нонсенс-мутацій порівняно з GC-.

[0021] Фіг. 8. Оцінка активності GR для різних типів пухлин і підмножин ACC. ACC продемонстрував високу GR-керовану генну активність порівняно з іншими пухлинами і незалежно від гормонального статусу (див. вставку).

[0022] Фіг. 9. Виведення генної сигнатури, яка розрізняє випадки GC+/- ACC методом випадкового лісу. NLRP1 і ZNF683 (виділені) були ідентифіковані як важливі компоненти сигнатури. Показано лише сигнатурні гени, які перевищують порогове значення 0,0028 (де "a.u." означає штучні одиниці важливості для кожного гена).

[0023] Фіг. 10A. Застосування сигнатури гена ACC до пухлин TCGA. Зверніть увагу, що дані про пухлини ACC відображаються в обох крайніх лівих полях (позначені смугою над міткою "ACC"). Точки даних для пацієнтів з ACC без надлишку GC (GC-) і пацієнтів з надлишком GC (GC+) окремо позначені стрілками над відповідними квадратами. Передбачається, що увеальна (UVM) і шкірна меланоми шкіри (SKCM) мають найвищу частоту пухлин, які нагадують GC+ACC.

[0024] Фіг. 10B. Прогнозована частота випадків пухлин, схожих на GC+ACC. Передбачається, що увеальна (UVM) і шкірна меланоми шкіри (SKCM) мають найвищу частоту пухлин, які нагадують GC+ACC.

[0025] Фіг. 11A. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на ізольовані NK-клітини людини in vitro. Додавання релакориланту значно покращило активацію природних клітин-кілерів (NK) у відповідь на IL-2.

[0026] Фіг. 11B. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на ізольовані NK-клітини людини in vitro. Додавання релакориланту значно покращило проліферацію NK-клітин у відповідь на IL-2.

[0027] Фіг. 12A. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на секрецію цитокінів ізольованих NK-клітин людини і експресію генів. Додавання релакориланту покращило секрецію інтерферону γ (IFNγ) порівняно з NK-клітинами, обробленими лише кортизолом.

[0028] Фіг. 12B. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на секрецію цитокінів ізольованих NK-клітин людини і експресію генів. Додавання релакориланту покращило секрецію фактора некрозу пухлин (TNFα) порівняно з NK-клітинами, обробленими лише кортизолом.

[0029] Фіг. 12C. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на секрецію цитокінів ізольованих NK-клітин людини і експресію генів. Додавання релакориланту покращило секрецію організму A порівняно з NK-клітинами, обробленими лише кортизолом.

[0030] Фіг. 12D. Вплив стимуляції IL-2, кортизолом і/або релакорилантом на експресію генів ізольованих NK-клітин людини. Транскрипція IFNG (який кодує IFNγ) також покращується релакорилантом разом з іншими ключовими регуляторами активності NK, включаючи LAG3 і IL2RA (який кодує рецептор інтерлейкіну 2 (IL2)).

[0031] Фіг. 13A. Глюкокортикоїди пригнічують знищення пухлинних клітин NK-клітинами людини in vitro. Знищення клітин K562 при різних співвідношеннях ефектор:клітини пухлини в умовах лікування, зазначених у легенді. Цьому протидіє релакорилант.

[0032] Фіг. 13B. Глюкокортикоїди пригнічують знищення пухлинних клітин NK-клітинами людини in vitro. При співвідношенні ефектор:клітини пухлини 5:1 значне зниження знищення пухлинних клітин у присутності кортизолу нейтралізується релакорилантом.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

a. Вступ

[0033] Заявник проаналізував транскрипцію гена пухлини адренокортикальної карциноми (ACC); дані були скринінговані для ідентифікації такої транскрипції генів у пацієнтів з ACC з надлишком глюкокортикоїдів (GC) і пацієнтів без нього (наприклад, надлишком кортизолу). Заявник виявив, що надлишок кортизолу змінює експресію 858 генів в адренокортикальній карциномі (ACC). Зокрема, гени, залучені до цитотоксичності, опосередкованої природними кілерами (NK), диференціації клітин TH17, передачі сигналів рецепторів T-клітин, диференціації TH1/2, а також процесингу і презентації антигену були знижені в пухлинах ACC у пацієнтів з надлишком кортизолу (GC+; див. Фіг. 1). Подальші відмінності також показані на Фіг. 1 і в інших місцях цього документа.

[0034] Заявник також виявив, що наявність специфічних імунних клітин була різною в пухлинах ACC з надлишком кортизолу або без нього. Наївні і клітини пам'яті CD4+, CD8+, CD8+ центральні клітини пам'яті і природні T-клітини-кілери (NKT) були нижчими у випадках GC+ (див. Фіг. 2). Навпаки, пухлиноасоційовані нейтрофіли (TAN) були вищими у пацієнтів з ACC із GC+.

[0035] Клінічна відповідь пацієнта на інгібітори контрольних точок антитіл залежить від імунної системи. Зокрема, функція T-клітин і презентація антигену є критичними для клінічної ефективності інгібіторів контрольних точок антитіл. Крім того, інфільтрація імунних клітин в пухлину пов'язана з клінічною ефективністю інгібіторів контрольних точок антитіл. Пухлини з низьким числом T-клітин або з високою інфільтрацією нейтрофілів, як правило, погано реагують на інгібітори контрольних точок антитіл.

[0036] Заявник розкриває тут, що введення інгібітора контрольної точки антитіла разом з введенням SGRM, де введення SGRM є ефективним для зменшення або зворотного впливу надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу, може покращити відповідь цього пацієнта на введення інгібітора контрольної точки антитіла, тим самим покращуючи лікування пацієнта з ACC з надлишком кортизолу. У варіантах застосування введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіл може бути ефективним для зменшення або усунення ефектів надлишку кортизолу у пацієнта з ACC з надлишком кортизолу і може бути ефективним для зменшення навантаження пухлини ACC у пацієнта.

[0037] Заявник додатково розкриває тут введення інгібітора контрольної точки антитіла разом із введенням SGRM, де введення SGRM є ефективним для відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і NK-клітин у пацієнта (включаючи пухлину ACC цього пацієнта). Таке відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і NK-клітин може покращити реакцію пацієнта на введення інгібітора контрольної точки антитіл і, таким чином, покращити лікування пацієнта з ACC з надлишком кортизолу. У варіантах застосування введення SGRM, ефективного для відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і NK-клітин у пацієнта (включаючи пухлину ACC у цього пацієнта), може бути ефективним для зменшення навантаження пухлини ACC у пацієнта.

[0038] Заявник додатково розкриває тут введення інгібітора контрольної точки антитіла разом із введенням SGRM, причому введення SGRM є ефективним для посилення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC у пацієнта. Така підвищена інфільтрація Т-клітин і NK-клітин може покращити реакцію пацієнта на введення інгібітора контрольних точок антитіл і, таким чином, покращити лікування пацієнта з ACC з надлишком кортизолу. В варіантах застосування введення SGRM, ефективного для збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC у пацієнта, може бути ефективним для зменшення навантаження на пухлину ACC у пацієнта.

[0039] Заявник додатково розкриває тут введення інгібітора контрольної точки антитіла разом із введенням SGRM, де введення SGRM є ефективним для зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта. Таке зниження інфільтрації нейтрофілів може покращити реакцію пацієнта на введення інгібітора контрольної точки антитіл і, таким чином, покращити лікування пацієнта з ACC з надлишком кортизолу. В варіантах застосування введення SGRM, ефективного для зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта, може бути ефективним для зменшення навантаження на пухлину ACC у пацієнта.

b. визначення

[0040] Термін "приблизно" при використанні стосовно попередньо визначеного значення означає діапазон, який охоплює плюс або мінус 10 % попередньо визначеного значення.

[0041] Інформацію про рак можна знайти, наприклад, в Атласі геному раку (TGCA). Доступ до TGCA можна знайти на веб-сайті Національного інституту раку (www.cancer.gov) на сторінці "about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga". Наступні скорочення використовуються тут для позначення різних типів раку:

ACC	Адренокортикальна карцинома
BLCA	Уротеліальна карцинома сечового міхура
BRCA	Інвазивна карцинома молочної залози
CESC	Плоскоклітинний рак шийки матки і ендоцервікальна аденокарцинома
CHOL	Холангіокарцинома
LIHC	Гепатоцелюлярна карцинома печінки
LUAD	Аденокарцинома легені
LGG	Гліома низького ступеня злоякісності
LUSC	Плоскоклітинний рак легень
OV	Серозна цистаденокарцинома яєчника
PAAD	Аденокарцинома підшлункової залози
PRAD	Аденокарцинома простати
SKCM	Меланома шкіри
UVM	Увеальна меланома

[0042] Терміни "пухлина" і "рак", які використовуються в цьому документі, використовуються як взаємозамінні і обидва стосуються аномального росту тканини, який є результатом надмірного поділу клітин. Пухлина, яка вражає навколишні тканини і/або може метастазувати, називається "злоякісною". Пухлина, яка не дає метастазів, називається "доброякісною".

[0043] Термін "адренокортикальна карцинома" і акронім "ACC" використовуються як взаємозамінні для позначення адренокарцином надниркових залоз.

[0044] Використовуваний тут термін "природна клітина-кілер" і абревіатури "NK-клітина", "NKT-клітина" тощо, включаючи і форми їхньої множини, використовуються, як відомо в цій галузі, для позначення цитотоксичних лімфоцитів імунної системи.

[0045] Використовуваний тут термін "Т-клітина" використовується, як відомо в цій галузі техніки, для позначення лімфоцитів, одержаних з тимуса, які відіграють важливу роль в імунній відповіді.

[0046] Використовуваний тут термін "нейтрофіл" використовується, як відомо в цій галузі техніки, для позначення найпоширенішого типу білих кров'яних клітин, які є найпоширенішим типом гранулоцитів у ссавців. Нейтрофіли також іноді називають "нейтроцитами".

[0047] Використовуваний тут термін "інфільтрація" стосується інвазії і заселення тканини (такої як пухлина ACC) клітинами, які виникли в окремій тканині, такій як-от Т-клітини, NK-клітини або нейтрофіли.

[0048] Використовуваний тут термін "пацієнт" відноситься до людини, яка одержує або одержуватиме, або одержувала медичну допомогу з приводу захворювання або стану.

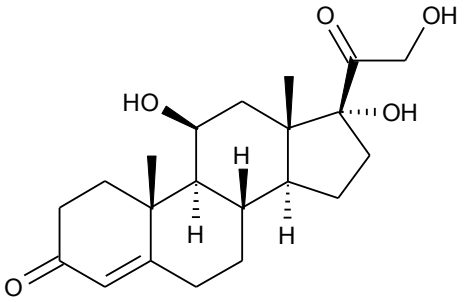
[0049] Використовувані тут терміни "призначення", "введення", "введений" або "надання допомоги" стосуються введення суб'єкту або пацієнту сполуки або композиції (наприклад, описаної тут). Наприклад, сполуки або композиції можна вводити пацієнту перорально.

[0050] Використовувані тут терміни "призначення", "введення", "введений" або "надання допомоги" стосуються надання суб'єкту або пацієнту сполуки або композиції (наприклад, описаної тут). Введення може здійснюватися шляхом перорального введення (тобто суб'єкт одержує сполуку або композицію через рот у вигляді таблетки, капсули, рідини або в іншій формі, придатній для введення через рот). Пероральне введення може бути букальним (коли сполука або композиція утримується в роті, наприклад, під язиком, і всмоктується там). Введення може здійснюватися шляхом ін'єкції, тобто доставки сполуки або композиції з допомогою голки, мікроголки, ін'єктора під тиском або іншим способом проколювання шкіри або силового проходження сполуки або композиції крізь шкіру суб'єкта. Ін'єкція може бути внутрішньовенною (тобто у вену); внутрішньоартеріальною (тобто в артерію); внутрішньоочеревинною (тобто в очеревину); внутрішньом'язовою (тобто в м'яз); або іншим шляхом введення. Шляхи введення також можуть включати ректальний, вагінальний, трансдермальний, через легені (наприклад, шляхом інгаляції), підшкірний (наприклад, шляхом всмоктування в шкіру з імплантату, який містить сполуку або композицію), або іншим шляхом.

[0051] Використовуваний тут термін "адренокортикотропний гормон" (ACTH) відноситься до пептидного гормону, який виробляється і секретується передньою долею гіпофіза, який стимулює кору надниркових залоз до секреції глюкокортикоїдних гормонів, які допомагають клітинам синтезувати глюкозу, катаболізувати білки, мобілізувати вільні жирні кислоти і пригнічують запалення при алергічних реакціях. Одним з таких глюкокортикоїдних гормонів є кортизол, який регулює обмін вуглеводів, жирів і білків. У здорових ссавців секреція ACTH жорстко регулюється. Секреція ACTH позитивно регулюється кортикотропін релізинг гормоном (CRH), який виділяється гіпоталамусом. Секреція ACTH негативно регулюється кортизолом і іншими глюкокортикоїдами.

Т[0052] ермін "вимірювання рівня" в контексті ACTH, кортизолу або іншого аналіту означає визначення, виявлення або кількісне визначення кількості, рівня або концентрації, наприклад, кортизолу, ACTH або іншого стероїду в зразку, одержаному від суб'єкта. Зразок може бути, наприклад, зразком крові, зразком слини, зразком сечі або іншим зразком, одержаним від пацієнта. Рівень можна виміряти з частини зразка. Наприклад, рівень (ACTH або кортизолу) можна виміряти у фракції плазми зразка крові; можна виміряти у фракції сироватки зразка крові; або у варіантах застосування, можна виміряти в цільній крові; можна виміряти в слині; можна виміряти в сечі; або виміряти в інших рідинах організму.

Термін "кортизол" відноситься до природного глюкокортикоїдного гормону (також відомого як гідрокортизон), який виробляється пучковою зоною надниркової залози. Кортизол має таку структуру:



.

[0053] Термін "загальний кортизол" стосується кортизолу, зв'язаного з кортизолзв'язувальним глобуліном (CBG або транскортином), і вільного кортизолу (кортизолу, який не зв'язаний з CBG). Термін "вільний кортизол" відноситься до кортизолу, який не зв'язаний з кортизолзв'язувальним глобуліном (CBG або транскортином). Використовуваний тут термін "кортизол" відноситься до загального кортизолу, вільного кортизолу і/або кортизолу, зв'язаного з CBG.

[0054] Рівень кортизолу можна вимірювати в крові (наприклад, сироватці або плазмі), сечі, слині і інших рідинах організму. Вільний кортизол в сечі (UFC, міра кортизолу в сечі, яка виділяється протягом 24 год.) - це поширений метод вимірювання рівня кортизолу, який маскує добові коливання кортизолу, потребуючи проби за добу. Кортизол в плазмі (показник рівня кортизолу під час взяття зразка крові) часто використовується для тестування на пригнічення дексаметазоном (який перевіряє реакцію пацієнта на швидке підвищення рівня глюкокортикоїдів). Крім того, рівень кортизолу також можна виміряти в зразку сироватки відповідно до методів, відомих у цій галузі техніки. Також можна виміряти рівень кортизолу в слині. Числове значення рівня кортизолу відрізняється в різних методах вимірювання; тобто рівні кортизолу в крові (наприклад, рівні у сироватці або у плазмі) зразок кортизолу під час взяття зразка крові, чисельно відрізняється від рівня кортизолу в слині (зразок кортизолу під час взяття зразка слини) і чисельно відрізняється від рівня кортизолу в сечі рівень вільного кортизолу (який надає рівень кортизолу протягом 24-годинного періоду).

[0055] Числове значення рівня кортизолу відрізняється в різних методах вимірювання; тобто рівні кортизолу в крові (наприклад, рівні сироватки або плазми) зразок кортизолу під час взяття зразка крові, чисельно відрізняється від рівня кортизолу в слині (зразок кортизолу під час взяття зразка слини) і чисельно відрізняється від рівня кортизолу в сечі рівень вільного кортизолу (який представляє рівень кортизолу протягом 24-годинного періоду). У переважних варіантах здійснення рівні кортизолу вимірюють з використанням LC-MS/MS, як, наприклад, вироблений Quest Diagnostics (Secaucus, N.J. 07094).

[0056] Термін "нормальний рівень" відноситься до середнього рівня аналіту, визначеного вимірюваннями зразків, одержаних від кількох здорових суб'єктів. Для порівняння необхідно порівнювати ті самі типи вимірювань (наприклад, плазма або сироватка; слина або сеча).

[0057] Термін "нормальний рівень кортизолу" відноситься до середнього рівня кортизолу, визначеного шляхом вимірювання зразків (наприклад, зразків сироватки), одержаних від кількох здорових суб'єктів. Наприклад, як повідомляють Putignano et al. (European Journal of Endocrinology 145:165-171 (2001)), нормальний рівень кортизолу в плазмі здорових жінок становив близько 420 наномоль на літр (нмоль/л) о 8 ранку (вранці); близько 250 нмоль/л о 17:00 (вечір); і близько 90 нмоль/л о 12 ночі (пізно ввечері). Вимірювання рівня кортизолу в слині у цих жінок становило приблизно 14 нмоль/л о 8 ранку (вранці); близько 7 нмоль/л о 17:00 (вечір); і близько 5 нмоль/л о 12 ночі (пізно ввечері). Рівень вільного кортизолу в сечі, виміряний у цих здорових жінок, становив приблизно 130 нмоль на 24 год. (нмоль/24 год.). Рівень кортизолу пригнічується тестом на пригнічення дексаметазоном (DST), на що вказує рівень кортизолу в плазмі приблизно 24 нмоль/л після DST і рівень кортизолу в слині приблизно 4 нмоль/л після DST.

[0058] Заявник виявив, що вимірювання рівнів кортизолу у пацієнта з пухлиною ACC дозволяє ідентифікувати тих пацієнтів, яким буде корисно комбіноване лікування SGRM і інгібітором контрольної точки антитіл, шляхом визначення того, чи є у пацієнта надлишок кортизолу.

[0059] Використовуваний тут термін "надлишок кортизолу" стосується рівнів кортизолу, незалежно від вимірювання, які перевищують приблизно в 1,5 рази або перевищують приблизно в 2 рази рівні кортизолу, виміряні у здорових суб'єктів (причому рівні кортизолу у здорових суб'єктів вимірюються тими самими методами, що і кортизол у пацієнта). Наприклад,

використовуючи ранкові рівні кортизолу в плазмі Putignano та ін., надлишок кортизолу буде визначений, якщо пацієнт мав ранковий рівень кортизолу в плазмі приблизно 630 нмоль/л або більше, або приблизно 840 нмоль/л або більше. Використовуючи ранковий рівень кортизолу в слині Putignano та ін., можна було б визначити надлишок кортизолу, якщо ранковий рівень кортизолу в слині пацієнта становив приблизно 21 нмоль/л або більше, або приблизно 28 нмоль/л або більше. Використовуючи 24-годинний рівень вільного кортизолу в сечі Putignano та ін., надлишок кортизолу буде визначено, якщо пацієнт мав 24-годинний рівень кортизолу в сечі приблизно 195 нмоль/24 год. або більше, або приблизно 260 нмоль/24 год. або більше.

[0060] У варіантах здійснення комбіновані критерії можуть бути використані для ідентифікації пацієнтів з надлишком кортизолу. Наприклад, два або більше, або всі, або такі критерії можуть бути використані для визначення того, чи страждає пацієнт від надлишку кортизолу:

1. Вільний кортизол в сечі (UFC) перевищує верхню межу норми (ULN)
2. Кортизол у слині пізно вночі (LNSC) перевищує DST протягом 2 ночей
3. Тест на пригнічення дексаметазоном (DST) з рівнем кортизолу понад 1,8 мкг/дл (μg/dL)
4. Адренокортикотропний гормон (ACTH) менше 10 пікограмів на мілілітр (пг/мл)

[0061] Термін "стандартний контроль", який використовується в цьому документі, відноситься до зразка, який містить наперед визначену кількість аналіту (такого як ACTH або кортизол), придатного для використання в застосуванні цього винаходу, щоб служити основою порівняння для надання показань, відносна кількість аналіту (наприклад, ACTH або кортизолу), який присутній в досліджуваному зразку. Зразок, який служить стандартним контролем, забезпечує середню кількість аналіту, такого як ACTH або кортизол, який є репрезентативним для певного типу зразка (наприклад, плазма, сироватка, слина або сеча), взятого в певний час доби (наприклад, о 8 ранку) від звичайної людини, яка не страждає або не має підвищеного ризику розвитку гіпокаліємії або будь-якого пов'язаного з нею розладу чи ускладнення і якій було призначено таке саме лікування GRM. Використовуваний в цьому документі, "зразок крові" може бути зразком цільної крові, зразком сироватки, зразком плазми або зразком клітин крові відповідно до вимірювання рівня аналіту відомими в цій галузі методами згідно з традиційним використанням. Подібним чином, "рівень крові" конкретного аналіту може бути рівнем аналіту в цільній крові, сироватці, плазмі або клітинах крові. Наприклад, рівень калію, ACTH або кортизолу в крові може бути рівнем кожного аналіту в зразку сироватки або плазми, взятому у досліджуваного суб'єкта.

[0062] Термін "середній", який використовується в контексті опису особи (особливо людини), яка не має захворювання і не має підвищеного ризику розвитку гіпокаліємії або будь-якого зв'язаного стану чи розладу до лікування GRM, відноситься до певних характеристик, таких як-от рівень або кількість аналіту (наприклад, ACTH або кортизолу), присутнього в зразку, взятому у особи, яка не одержувала лікування GRM, які є репрезентативними для середньої кількості або рівня аналіту, знайденого у випадково вибраній групі індивідуумів, у яких не було діагностовано гіпокаліємію чи будь-які пов'язані з нею захворювання, або стани не схильні до неї, і тому можуть служити "середнім нормальним значенням" або "стандартним контрольним значенням" для конкретного аналіту до лікування GRM. Ця відібрана група повинна складатися з достатньої кількості осіб (наприклад, принаймні 200 або 500 або більше), щоб середнє значення (тобто рівень або кількість) досліджуваної речовини (наприклад, ACTH або кортизолу), оцінене серед цих осіб, відображало, з достатньою точністю, відповідний рівень або кількість аналіту, виявленого в загальній популяції осіб без гіпокаліємії без відомого ризику розладу або пов'язаних станів після лікування GRM. В деяких випадках відібрана група осіб, як правило, має однакову стать, подібний вік (наприклад, у межах 5- або 10-річної різниці один від одного), має подібне етнічне і медичне походження. Залежно від аналіту може знадобитися визначити середнє значення або стандартне контрольне значення на основі зразків, взятих у цих осіб приблизно в один і той самий час протягом дня (наприклад, 6:00, 8:00, 12:00, 16:00 або 18:00). Середнє або стандартне контрольне значення будь-якого конкретного аналіту також може змінюватися залежно від конкретного аналізу або формату аналізу (включаючи конкретні реагенти), які використовуються для кількісного вимірювання аналіту, і тому може бути доступним або шляхом експерименту, або шляхом аналізу інформації від виробника.

[0063] Термін "глюкокортикостероїд" ("GC") або "глюкокортикоїд" відноситься до стероїдного гормону, який зв'язується з рецептором глюкокортикоїду. Глюкокортикостероїди зазвичай характеризуються наявністю 21 атома вуглецю, α,β-ненасиченого кетону в кільці A і α-кетольної групи, приєднаної до кільця D. Вони відрізняються ступенем оксигенації або гідроксилювання в C-11, C-17, і C-19; див. Rawn, "Біосинтез і транспортування мембранних ліпідів і утворення

похідних холестерину", у Biochemistry, Daisy et al. (eds.), 1989, pg. 567. Кортизол є глюкокортикостероїдом.

[0064] Мінералокортикоїдний рецептор (MR), також відомий як глюкокортикоїдний рецептор типу I (GR I), активується альдостероном у людей.

[0065] Використовуваний тут термін "глюкокортикоїдний рецептор" ("GR") відноситься до GR типу II, сімейства внутрішньоклітинних рецепторів, які специфічно зв'язуються з кортизолом і/або аналогами кортизолу, такими як дексаметазон (див., наприклад, Turner & Muller, J. Mol. Endocrinol. October 1, 2005 35 283-292). Глюкокортикоїдний рецептор також називають рецептором кортизолу. Термін включає ізоформи GR, рекомбінантний GR і мутований GR.

[0066] Термін "модулятор глюкокортикоїдного рецептора" (GRM) відноситься до будь-якої сполуки, яка модулює будь-яку біологічну відповідь, пов'язану зі зв'язуванням GR з агоністом. Наприклад, GRM, який діє як агоніст, такий як дексаметазон, підвищує активність тирозинамінотрансферази (TAT) в клітинах HepG2 (лінія клітин гепатоцелюлярної карциноми печінки людини; ECACC, Великобританія). GRM, який діє як антагоніст, такий як міфепристон, знижує активність тирозинамінотрансферази (TAT) в клітинах HepG2. Активність TAT можна виміряти, як зазначено в літературі A. Ali et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 2441-2452.

[0067] Використовуваний тут термін "селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора" (SGRM) відноситься до будь-якої композиції або сполуки, яка модулює будь-яку біологічну відповідь, пов'язану із зв'язуванням GR з агоністом. З "селективним" препаратом переважно зв'язується з GR, а не з іншими ядерними рецепторами, такими як-от рецептор прогестерону (PR), рецептор мінералокортикоїдів (MR) або рецептор андрогенів (AR). Переважно, щоб селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язував GR із спорідненістю, яка в 10 разів перевищує (1/10 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, і AR, і PR, або до MR, AR і PR. У більш переважному варіанті здійснення селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язує GR із спорідненістю, яка в 100 разів перевищує (1/100 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, як AR, так і PR, або до MR, AR і PR. В іншому варіанті здійснення селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язує GR із спорідненістю, яка в 1000 разів перевищує (1/1000 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, і AR, і PR, або до MR, AR і PR. Релакорилант це SGRM (новітній антиглюкокортикоїд див. Relacorilant-Wikipedia).

[0068] "Антагоніст глюкокортикоїдного рецептора" (GRA) відноситься до будь-якої сполуки, яка інгібує будь-яку біологічну відповідь, пов'язану зі зв'язуванням GR з агоністом. Відповідно, GR антагоністи можна ідентифікувати шляхом вимірювання здатності сполуки інгібувати дію дексаметазону. Активність TAT можна виміряти, як зазначено в літературі A. Ali et al., J. Med. Chem., 2004, 47, 2441-2452. Антагоніст – це сполука з IC50 (половина максимальної концентрації інгібування) менше 10 мікромолей. Див. Приклад 1 патенту U.S. № 8,859,774, повний зміст якого включено сюди шляхом посилання у повному обсязі.

[0069] Використовуваний тут термін "селективний антагоніст глюкокортикоїдних рецепторів" (SGRA) відноситься до будь-якої композиції або сполуки, яка інгібує будь-яку біологічну відповідь, пов'язану зі зв'язуванням GR з агоністом (де інгібування визначається відносно відповіді за відсутності сполуки). З "селективним" препаратом переважно зв'язується з GR, а не з іншими ядерними рецепторами, такими як-от рецептор прогестерону (PR), рецептор мінералокортикоїдів (MR) або рецептор андрогенів (AR). Переважно, щоб селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язував GR із спорідненістю, яка в 10 разів перевищує (1/10 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, і AR, і PR, або до MR, AR і PR. У більш переважному варіанті здійснення селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язує GR із спорідненістю, яка в 100 разів перевищує (1/100 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, як AR, так і PR, або до MR, AR і PR. В іншому варіанті здійснення селективний модулятор глюкокортикоїдного рецептора зв'язує GR із спорідненістю, яка в 1000 разів перевищує (1/1000 значення Kd), ніж його спорідненість до MR, AR або PR, як MR, так і PR, як MR, так і AR, і AR, і PR, або до MR, AR і PR. Релакорилант (CORT125134) це SGRA.

[0070] Використовувана в цьому документі, фраза "не призначений для лікування модулятором глюкокортикоїдних рецепторів" відноситься до пацієнта, який не страждає від будь-якого захворювання, визнаного медичним співтовариством як таке, що піддається ефективному лікуванню антагоністами глюкокортикоїдних рецепторів, за винятком печінкового стеатозу. Стани, відомі в цій галузі і прийняті медичною спільнотою як такі, що ефективно піддаються лікуванню антагоністами глюкокортикоїдних рецепторів, включають: психоз,

пов'язаний з терапією інтерфероном-α, велику психопатичну депресію, деменцію, стресові розлади, автоімунні захворювання, пошкодження нервової системи і синдром Кушинга.

[0071] Термін "імунна відповідь" відноситься до дії, наприклад, лімфоцитів, антигенпрезентуючих клітин, фагоцитуючих клітин, гранулоцитів і розчинних макромолекул, які виробляються вищезазначеними клітинами або печінкою (включаючи антитіла, цитокіни і комплемент), що призводить до селективного пошкодження, знищення або усунення з організму людини патогенів, клітин або тканин, інфікованих патогенами, ракових клітин або, у випадках автоімунного або патологічного запалення, нормальних клітин або тканин людини.

[0072] Використовуваний тут термін "чутливий до інгібітора контрольної точки рак" відноситься до раку, який реагує на інгібітори контрольної точки. Введення одного або кількох інгібіторів контрольних точок пацієнтам із такою пухлиною призведе до зменшення навантаження на пухлину ACC, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин в пухлину ACC, і зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта або інший бажаний сприятливий клінічний результат, пов'язаний із покращенням раку.

[0073] Використовуваний тут термін "ефективна кількість" або "терапевтична кількість" відноситься до кількості фармакологічного агента, ефективного для лікування, усунення або пом'якшення принаймні одного симптому захворювання, яке лікують. В деяких випадках "терапевтично ефективна кількість" або "ефективна кількість" може стосуватися кількості функціонального агента або фармацевтичної композиції, корисної для прояву виявленого терапевтичного або інгібуючого ефекту. Ефект можна виявити за допомоги будь-якого методу аналізу, відомого в цій галузі. Ефективна кількість може бути кількістю, ефективною для одержання протипухлинної відповіді. Ефективна кількість може бути кількістю, ефективною для викликання терапевтично сприятливої відповіді (наприклад, протипухлинної, гуморальної і/або клітинної імунної відповіді) у суб'єкта-реципієнта, наприклад такої, що призводить до пригнічення росту або загибелі клітин-мішеней. Для цілей цього розкриття ефективна кількість SGRM або ефективна кількість інгібітора контрольної точки антитіла (і, необов'язково, хіміотерапевтичного засобу) є кількістю, яка зменшить навантаження на пухлину ACC, відновить Т-клітини і природні клітини-кілери (NK) сигнальні шляхи, збільшують інфільтрацію Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшують інфільтрацію нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта або забезпечують інші бажані сприятливі клінічні результати, пов'язані з раком.

[0074] Використовувана тут фраза "кількість, ефективна для посилення дії" стосується кількості фармакологічного агента, ефективного для посилення активності іншого терапевтичного агента при лікуванні, усуненні або пом'якшенні принаймні одного симптому захворювання, яке лікується. Наприклад, ефективна кількість SGRM, що вводиться в комбінації з інгібітором контрольної точки антитіла, є такою кількістю SGRM, яка покращує терапевтичну відповідь на цей інгібітор контрольної точки антитіла. Агент, який використовується для посилення активності іншого, може бути ефективним або неефективним при лікуванні, усуненні або послабленні симптомів самого захворювання. В деяких випадках підсилювальний агент є не ефективним, і ефект посилення може проявлятися підвищеним ступенем полегшення симптому в результаті лікування комбінацією двох агентів порівняно з лікуванням лише терапевтичним агентом. В деяких випадках підсилювальний агент сам по собі ефективний при лікуванні симптомів, підсилювальний ефект може проявлятися синергічним ефектом між підсилювальним агентом і терапевтичним агентом. Для цілей цього розкриття SGRM діє як підсилювальний агент для посилення активності інгібіторів контрольних точок при лікуванні раку, незалежно від того, чи буде SGRM ефективним при лікуванні раку, якщо його вводити окремо. В деяких варіантах можна досягти ефекту посилення від 10 % до 1000 %. В деяких варіантах реалізації SGRM вводять у кількості, яка робить пухлину чутливою до інгібітора контрольної точки, тобто демонструє зменшення навантаження на пухлину ACC, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), підвищення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта або інші пов'язані клінічні переваги, які інакше не виникли б, якщо пухлину лікують інгібітором контрольної точки антитіл за відсутності SGRM.

[0075] Використовуваний тут термін "комбінована терапія" стосується введення принаймні двох фармацевтичних агентів суб'єкту для лікування захворювання. Два агенти можна вводити одночасно або послідовно, у будь-якому порядку, протягом всього або частини періоду лікування. Два агенти можна вводити, дотримуючись однакових або різних схем дозування. В деяких випадках один агент вводять відповідно до запланованої схеми, тоді як інший препарат вводять з перервами. В деяких випадках обидва препарати вводять з перервами. В деяких варіантах застосування один фармацевтичний агент, наприклад, SGRM, вводять щоденно, а

інший фармацевтичний агент, наприклад, інгібітор контрольної точки антитіла, вводять кожні два, три або чотири дні, або раз на тиждень, або раз на два тижні.

[0076] Використовуваний тут термін "спільне введення" означає введення двох композицій одночасно або протягом короткого проміжку часу одна від одної, наприклад, приблизно в межах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, або 24 год. одна від одної.

[0077] Використовуваний в цьому документі, термін "білок контрольної точки" відноситься до білка, який присутній на поверхні певних типів клітин, наприклад Т-клітини і певні клітини пухлини, а також можуть індукувати сигнальні шляхи контрольних точок і призводити до пригнічення імунної відповіді. Загальновідомі білки контрольних точок включають CTLA4, PD-1, PD-L1, LAG3, B7-H3, B7-H4, TIM3, CD160, CD244, VISTA, TIGIT і BTLA. (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264; Baksh, 2015, Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):363-77). Серед них CTLA4, PD-1 і PD-L1 є найбільш добре вивченими, а терапії, націлені на ці білки, клінічно більш прогресивні, ніж терапії, націлені на інші білки контрольних точок.

[0078] Використовуваний тут термін "PD-1" стосується білка програмованої клітинної смерті 1 (також відомого як CD279), білка клітинної поверхні мембрани суперродини імуноглобулінів. PD-1 експресується В-клітинами, Т-клітинами і NK-клітинами. Основна роль PD-1 полягає в обмеженні активності Т-клітин в периферичних тканинах під час запалення у відповідь на інфекцію, а також в обмеженні автоімунітету. Експресія PD-1 індукується на активованих Т-клітинах, а зв'язування PD-1 з одним із його ендогенних лігандів пригнічує активацію Т-клітин шляхом інгібування стимулюючих кіназ. PD-1 також пригнічує "стоп-сигнал" TCR. PD-1 сильно експресується на клітинах Treg (регуляторних Т-клітинах) і може збільшувати їх проліферацію в присутності ліганду (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264).

[0079] Використовуваний тут, термін "PD-L1" стосується ліганду 1 програмованої клітинної смерті 1 (також відомого як CD274 і B7-H1), ліганд для PD-1. PD-L1 виявляється на активованих Т-клітинах, В-клітинах, мієлоїдних клітинах, макрофагах і пухлинних клітинах. Хоча існує два ендогенних ліганди для PD-1, PD-L1 і PD-L2, протипухлинна терапія сфокусована на анти-PD-L1. Комплекс PD-1 і PD-L1 пригнічує проліферацію CD8+ Т-клітин і знижує імунну відповідь (Topalian et al., 2012, N. Engl J. Med. 366:2443-54; Brahmer et al., 2012, N. Engl J. Med. 366:2455-65).

[0080] Використовуваний тут термін "CTLA4" стосується цитотоксичного Т-лімфоцитного антигену 4 (також відомого як CD152), члена надродини імуноглобулінів, який експресується виключно на Т-клітинах. Як повідомляється, CTLA4 пригнічує активацію Т-клітин, інгібує активність допоміжних Т-клітин і посилює імуносупресивну активність регуляторних Т-клітин. Хоча точний механізм дії CTL4-A залишається ще не дослідженим, було припущено, що він пригнічує активацію Т-клітин, випереджаючи CD28 у зв'язуванні з CD80 і CD86 на антигенпрезентуючих клітинах, а також активно доставляючи інгібіторні сигнали до Т-клітин (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264).

[0081] Використовуваний тут термін "інгібітор контрольної точки" відноситься до будь-яких молекул, включаючи антитіла і малі молекули, які блокують шлях імуносупресії, індукований одним або кількома білками контрольної точки. Терапію, яка використовує інгібітор контрольної точки для лікування розладу, такого як рак, можна назвати терапією інгібітором контрольної точки імунної системи; акронім "ICI" означає інгібітор контрольної точки імунної системи. У варіантах реалізації ICI терапія використовує інгібітори контрольних точок антитіл, яка включає введення інгібіторів контрольних точок антитіл пацієнту, який потребує такої терапії, яка може бути комбінованою терапією, яка включає GRM, SGRM, GRA або SGRA в комбінації з інгібітором контрольних точок антитіл. У варіантах реалізації ICI терапія використовує низькомолекулярні інгібітори контрольних точок, яка включає введення низькомолекулярного інгібітора контрольних точок пацієнту, який потребує такої терапії, яка може бути комбінованою терапією, яка включає GRM, SGRM, GRA або SGRA у поєднанні з низькомолекулярним інгібітором контрольних точок.

[0082] Використовуваний тут термін "інгібітор контрольної точки антитіла" відноситься до антитіл, які блокують шлях імуносупресії, індукований одним або декількома білками контрольної точки. Терапія, яка використовує інгібітор контрольної точки для лікування розладу, такого як рак, може бути названа, наприклад, терапією інгібітором контрольної точки антитіла. У варіантах застосування терапія інгібітором контрольної точки антитіла включає введення інгібітора контрольної точки антитіла пацієнту, який потребує такої терапії, яка може бути комбінованою терапією, яка включає GRM, SGRM, GRA або SGRA у комбінації з інгібітором контрольної точки антитіла.

[0083] Використовуваний тут термін "антитіло, ефективне проти білка контрольної точки" відноситься до антитіла, яке може зв'язуватися з білком контрольної точки і антагонізувати

функцію білка контрольної точки у пригніченні імунної відповіді. Наприклад, антитіло проти PD-1 відноситься до антитіла, яке може зв'язуватися з PD-1 і блокувати інгібіторну функцію PD-1 відносно імунної відповіді, наприклад, шляхом блокування взаємодії між PD-1 і PD-L1. В деяких випадках антитіло може діяти проти двох білків контрольних точок, тобто мати здатність зв'язуватися з двома білками контрольних точок і пригнічувати їхню функцію. "Антитіло, ефективне проти білка контрольної точки" є "інгібітором контрольної точки антитіла".

[0084] Використовуваний тут термін "антитіло" також включає повно розмірне антитіло, а також "антигензв'язувальну частину" антитіла. Термін "антигензв'язувальна частина", як він використовується в цьому документі, відноситься до одного або кількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, PD-1). Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплених терміном "антигензв'язувальна частина" антитіла, включають (i) фрагмент Fab, одновалентний фрагмент, який складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) фрагмент F(ab')2, двовалентний фрагмент, який містить два фрагменти Fab, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) фрагмент Fd, який складається з доменів VH і CH1; (iv) фрагмент Fv, який складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), який складається з домену VH; і (vi) ізольована область, яка визначає компліментарність (CDR). Крім того, хоча два домени фрагмента Fv, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати, використовуючи рекомбінантні методи, за допомогою синтетичного лінкера, який дає змогу зробити їх єдиним білковим ланцюгом, у якому VL і області VH об'єднуються, утворюючи одновалентні молекули (відомі як одноланцюгові Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; і Osbourn et al. 1998, Nature Biotechnology 16: 778). Такі одноланцюгові антитіла також охоплюються терміном "антигензв'язувальна частина" антитіла. Будь-які послідовності VH і VL специфічного scFv можуть бути пов'язані з кДНК константної області імуноглобуліну людини або геномними послідовностями, щоб генерувати експресійні вектори, які кодують повні молекули IgG або інші ізотипи. VH і VI також можна використовувати для одержання Fab, Fv або інших фрагментів імуноглобулінів з використанням хімії білка або технології рекомбінантної ДНК. Також охоплюються і інші форми одноланцюгових антитіл, такі як-от діатіла. Діатіла — це двовалентні, біспецифічні антитіла, в яких домени VH і VL експресуються в одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є надто коротким для утворення пари між двома доменами в одному ланцюзі, таким чином змушуючи домени спаровуватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і створювати два вузли зв'язування антигену (див., наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

[0085] Антитіла можуть бути поліклональними або моноклональними; ксеногенними, алогенними або сингенними; або їх модифіковані форми, наприклад гуманізовані, химерні тощо. Антитіла цього винаходу зв'язуються специфічно або значною мірою специфічно з одним або декількома білками контрольної точки. Термін "моноклональні антитіла" стосується популяції молекул антитіл, які містять лише один різновид антигензв'язувальної ділянки, здатної імунореагувати з певним епітопом антигену, тоді як терміни "поліклональні антитіла" і "композиція поліклональних антитіл" стосуються популяція молекул антитіл, які містять кілька видів сайтів зв'язування антигену, здатних взаємодіяти з певним антигеном. Композиція моноклонального антитіла зазвичай демонструє єдину афінність зв'язування з певним антигеном, з яким вона імунореагує.

[0086] Використовуваний тут, термін "композиція" призначений для охоплення продукту, який містить зазначені інгредієнти, такі як-от зазначені сполуки, їх таутомерні форми, їх похідні, їх аналоги, їх стереоізомери, їх поліморфи, їх дейтеровані види, їх фармацевтично прийнятні солі, складні ефіри, прості ефіри, метаболіти, суміші ізомерів, їх фармацевтично прийнятні сольвати і фармацевтично прийнятні композиції в зазначених кількостях, а також будь-який продукт, який є результатом, прямо або опосередковано, комбінації зазначених інгредієнтів в зазначених кількостях. Такий термін по відношенню до фармацевтичної композиції призначений для охоплення продукту, який містить активний(-і) інгредієнт(-и) і інертний(-і) інгредієнт(-и), які складають носій, а також будь-який продукт, який призводить, прямо або опосередковано, в комбінації, комплексотворення чи агрегації будь-яких двох або більше інгредієнтів, або внаслідок дисоціації одного чи більше інгредієнтів, або внаслідок інших типів реакцій чи взаємодій одного або більше інгредієнтів. Відповідно, фармацевтичні композиції цього винаходу охоплюють будь-яку композицію, одержану шляхом змішування сполук цього винаходу і їх фармацевтично прийнятних носіїв.

[0087] В деяких варіантах реалізації термін "складається по суті з" відноситься до композиції в рецептурі, єдиним активним інгредієнтом якої є зазначений активний інгредієнт, однак можуть

бути включені інші сполуки, які призначені для стабілізації, збереження композиції тощо, але не відіграють безпосередньої участі в терапевтичному ефекті зазначеної діючої речовини. В деяких варіантах застосування термін "по суті складається з" може стосуватися композицій, які містять активний інгредієнт і компоненти, які полегшують вивільнення активного інгредієнта. Наприклад, композиція може містити один або більше компонентів, які забезпечують пролонговане вивільнення активного інгредієнта для суб'єкта протягом часу. В деяких варіантах застосування термін "що складається" відноситься до композиції, яка містить активний інгредієнт і фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

[0088] Використовуваний тут термін "сполука" використовується для позначення молекулярної частини унікальної хімічної структури, яку можна ідентифікувати. Молекулярна половина ("сполука") може існувати у вільній формі, в якій вона не зв'язана з іншими молекулами. Сполука також може існувати як частина більшого агрегату, в якому вона зв'язана з іншою(-ими) молекулою(-ами), але, незважаючи на це, зберігає свою хімічну ідентичність. Сольват, у якому молекулярна частина визначеної хімічної структури ("сполуки") пов'язана з молекулою(-ами) розчинника, є прикладом такої асоційованої форми. Гідрат - це сольват, в якому асоційованим розчинником є вода. Термін "сполука" стосується самої молекулярної частини (переліченої структури), незалежно від того, чи існує вона у вільній або в асоційованій формі.

[0089] Там, де групи замісників визначені їх звичайними хімічними формулами, написаними зліва направо, вони однаково охоплюють хімічно ідентичні замісники, які виникли б у результаті запису структури справа наліво, наприклад, -CH2O- еквівалентно -OCH2-.

[0090] Там, де групи замісників визначені їх звичайними хімічними формулами, написаними зліва направо, вони однаково охоплюють хімічно ідентичні замісники, які виникли б у результаті запису структури справа наліво, наприклад, -CH2O- еквівалентно -OCH2-.

[0091] "Алкіл" відноситься до прямого або розгалуженого, насиченого аліфатичного радикала, який має зазначену кількість атомів вуглецю. Алкіл може містити будь-яку кількість атомів вуглецю, наприклад C1-2, C1-3, C1-4, C1-5, C1-6, C1-7, C1-8, C1-9, C1-10, C2-3, C2-4, C2-5, C2-6, C3-4, C3-5, C3-6, C4-5, C4-6, і C5-6. Наприклад, C1-6 алкіл включає, але не обмежується ними, метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, ізопентил і гексил.

[0092] "Алкокси" відноситься до алкільної групи, яка має атом кисню, який з'єднує алкільну групу з точкою приєднання: алкіл-O-. Стосовно алкільної групи, алкоксигрупи можуть мати будь-яку прийнятну кількість атомів вуглецю, наприклад C1-6. Алкоксигрупи включають, наприклад, метокси, етокси, пропокси, ізопропокси, бутокси, 2-бутокси, ізобутокси, втор-бутокси, третбутокси, пентокси, гексокси тощо.

[0093] "Галоген" відноситься до фтору, хлору, брому і йоду.

"Галоалкіл" відноситься до алкілу, як визначено вище, в якому деякі або всі атоми водню заміщені атомами галогену. Стосовно алкільної групи, галогеналкільні групи можуть мати будь-яку відповідну кількість атомів вуглецю, наприклад C1-6, і включають трифторметил, фторметил тощо.

[0094] Термін "перфтор" можна використовувати для визначення сполуки або радикалу, в якій всі атоми водню заміщені фтором. Наприклад, перфторметан включає 1,1,1-трифторметил.

[0095] "Галоалкокси" відноситься до алкоксигрупи, в якій деякі або всі атоми водню заміщені атомами галогену. Стосовно алкільної групи, галоалкоксигрупи можуть мати будь-яку відповідну кількість атомів вуглецю, наприклад C1-6. Алкоксигрупи можуть бути заміщені 1, 2, 3 або більшою кількістю галогенів. Коли всі атоми водню заміщені галогеном, наприклад, фтором, сполуки перезаміщені, наприклад, перфторовані. Галогеналкокси включає, але не обмежується цим, трифторметокси, 2,2,2-трифторетокси і перфторетокси.

[0096] "Циклоалкіл" означає насичену або частково ненасичену, моноциклічну, конденсовану біциклічну або місткову поліциклічну кільцеву структуру, що містить від 3 до 12 кільцевих атомів або зазначену кількість атомів. Циклоалкіл може містити будь-яку кількість атомів вуглецю, наприклад C3-6, C4-6, C5-6, C3-8, C4-8, C5-8, C6-8, C3-9, C3-10, C3-11, і C3-12. Насичені моноциклічні циклоалкільні кільця включають, наприклад, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил і циклооктил. Насичені біциклічні і поліциклічні циклоалкільні кільця включають, наприклад, норборнан, [2.2.2] біциклооктан, декагідронафталін і адамантан. Циклоалкільні групи також можуть бути частково ненасиченими, маючи один або кілька подвійних або потрійних зв'язків у кільці. Типові циклоалкільні групи, які є частково ненасиченими, включають, але не обмежуються ними циклобутен, циклопентен, циклогексен, циклогексадієн (1,3- і 1,4-ізомери), циклогептен, циклогептадієн, циклооктен, циклооктадієн (1,3-, 1, 4- і 1,5-ізомери), норборнен і норборнадієн. Коли циклоалкіл є насиченим моноциклічним C3-

8 циклоалкілом, типові групи включають, але не обмежуються цим, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил і циклооктил. Коли циклоалкіл є насиченим моноциклічним С3-6 циклоалкілом, типові групи включають, але не обмежуються ними циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил.

[0097] "Гетероциклоалкіл" відноситься до насиченої кільцевої системи, що містить від 3 до 12 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів N, O і S. Додаткові гетероатоми також можуть бути корисними, включаючи, але не обмежуючись ними B, Al, Si і P. Гетероатоми також можуть бути окиснені, такі як, але не обмежені ними -S(O)- і -S(O)2-. Гетероциклоалкільні групи можуть включати будь-яку кількість атомів у кільці, наприклад від 3 до 6, від 4 до 6, від 5 до 6, від 3 до 8, від 4 до 8, від 5 до 8, від 6 до 8, від 3 до 9, від 3 до 10, від 3 до 11 або від 3 до 12 членів кільця. Будь-яка відповідна кількість гетероатомів може бути включена до гетероциклоалкільних груп, наприклад 1, 2, 3 або 4, або 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4 або 3-4. Гетероциклоалкільна група може включати такі групи, як азиридин, азетидин, піролідин, піперидин, азепан, азокан, хінуклідин, піразолідин, імідазолідин, піперазин (1,2-, 1,3- і 1,4-ізомери), оксиран, оксетан, тетрагідрофуран оксан (тетрагідропіран), оксепан, тііран, тіетан, тіолан (тетрагідротіофен), тіан (тетрагідротіопіран), оксазолідин, ізоксалідин, тіазолідин, ізотіазолідин, діоксолан, дитіолан, морфолін, тіоморфолін, діоксан або дитіан. Гетероциклоалкільні групи також можуть бути злиті з ароматичними або неароматичними кільцевими системами з утворенням членів, включаючи, але не обмежуючись ним індолін.

[0098] Коли гетероциклоалкіл включає від 3 до 8 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, репрезентативні члени включають, але не обмежуються ними піролідин, піперидин, тетрагідрофуран, оксан, тетрагідротіофен, тіан, піразолідин, імідазолідин, піперазин, оксазолідин, ізоксазолідин, тіазолідин, ізотіазолідин, морфолін, тіоморфолін, діоксан і дитіан. Гетероциклоалкіл також може утворювати кільце з 5-6 членами кільця і 1-2 гетероатомами, з репрезентативними членами, включаючи, але не обмежуючись ними піролідин, піперидин, тетрагідрофуран, тетрагідротіофен, піразолідин, імідазолідин, піперазин, оксазолідин, ізоксазолідин, тіазолідин, ізотіазолідин і морфолін.

[0099] "Арил" відноситься до ароматичної кільцевої системи, яка має будь-яку прийнятну кількість кільцевих атомів і будь-яку прийнятну кількість кілець. Арильні групи можуть включати будь-яку відповідну кількість атомів у кільці, наприклад 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 або 16 атомів у кільці, а також від 6 до 10, від 6 до 12, або від 6 до 14 членів кільця. Арильні групи можуть бути моноциклічними, конденсованими з утворенням біциклічних або трициклічних груп або з'єднаними зв'язком з утворенням біарильної групи. Представники арильних груп включають феніл, нафтил і біфеніл. Інші арильні групи включають бензил, який має метиленову сполучну групу. Деякі арильні групи мають від 6 до 12 членів кільця, такі як-от феніл, нафтил або біфеніл. Інші арильні групи мають від 6 до 10 членів кільця, такі як-от феніл або нафтил. Деякі інші арильні групи мають 6 членів кільця, наприклад феніл. Арильні групи можуть бути заміщеними або незаміщеними.

[0100] "Гетероарил" відноситься до моноциклічного, конденсованого біциклічного або трициклічного ароматичного кільця, що містить від 5 до 16 атомів у кільці, в якому від 1 до 5 атомів у кільці є гетероатомом, таким як-от N, O або S. Додаткові гетероатоми також можуть бути корисними, включаючи, але не обмежуючись ними B, Al, Si і P. Гетероатоми також можуть бути окиснені, такі як-от, але не обмежуючись ними N-оксид, -S(O)-, і -S(O)2-. Гетероциклоалкільні групи можуть включати будь-яку кількість атомів у кільці, наприклад від 3 до 6, від 4 до 6, від 5 до 6, від 3 до 8, від 4 до 8, від 5 до 8, від 6 до 8, від 3 до 9, від 3 до 10, від 3 до 11 або від 3 до 12 членів кільця. Будь-яка відповідна кількість гетероатомів може бути включена в гетероарильні групи, такі як-от 1, 2, 3, 4 або 5; або від 1 до 2, від 1 до 3, від 1 до 4, від 1 до 5, від 2 до 3, від 2 до 4, від 2 до 5, від 3 до 4 або від 3 до 5. Гетероарильні групи можуть мати від 5 до 8 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, або від 5 до 8 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, або від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, або від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів. Гетероарильна група може включати такі групи, як пірол, піридин, імідазол, піразол, триазол, тетразол, піразин, піримідин, піридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- і 1,3,5-ізомери), тіофен, фуран, тіазол, ізотіазол, оксазол і ізоксазол. Гетероарильні групи також можуть бути злиті з ароматичними кільцевими системами, такими як-от фенільне кільце, з утворенням членів, включаючи, але не обмежуючись ними бензопіроли, такі як-от індол і ізоіндол, бензопіридини, такі як-от хінолін і ізохінолін, бензопіразин (хіноксалін), бензопіримідин (хіназолін), бензопіридазини, такі як-от фталазин і цинолін, бензотіофен і бензофуран. Інші гетероарильні групи включають гетероарильні кільця, пов'язані зв'язком, такі як-от біпіридин. Гетероарильні групи можуть бути заміщеними або незаміщеними.

[0101] Гетероарильні групи можуть бути зв'язані через будь-яке положення в кільці. Наприклад, пірол включає 1-, 2- і 3-пірол; піридин включає 2-, 3- і 4-піридин; імідазол включає 1-, 2-, 4- і 5-імідазол; піразол включає 1-, 3-, 4- і 5-піразол; триазол включає 1-, 4- і 5-триазол; тетразол включає 1- і 5-тетразол; піримідин включає 2-, 4-, 5- і 6-піримідин; піридазин включає 3- і 4-піридазин; 1,2,3-триазин включає 4- і 5-триазин; 1,2,4-триазин включає 3-, 5- і 6-триазин; 1,3,5-триазин включає 2-триазин; тіофен включає 2- і 3-тіофен; фуран включає 2- і 3-фуран; тіазол включає 2-, 4- і 5-тіазол; ізотіазол включає 3-, 4- і 5-ізотіазол; оксазол включає 2-, 4- і 5-оксазол; ізоксазол включає 3-, 4- і 5-ізоксазол; індол включає 1-, 2- і 3-індол; ізоіндол включає 1- і 2-ізоіндол; хінолін включає 2-, 3- і 4-хінолін; ізохінолін включає 1-, 3- і 4-ізохінолін; хіназолін включає 2- і 4-хіноазолін; цинолін включає 3- і 4-цинолін; бензотіофен включає 2- і 3-бензотіофен; і бензофуран включає 2- і 3-бензофуран.

[0102] Деякі гетероарильні групи містять від 5 до 10 членів кільця і від 1 до 3 атомів у кільці, включаючи N, O або S, такі як-от пірол, піридин, імідазол, піразол, триазол, піразин, піримідин, піридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- і 1,3,5-ізомери), тіофен, фуран, тіазол, ізотіазол, оксазол, ізоксазол, індол, ізоіндол, хінолін, ізохінолін, хіноксалін, хіназолін, фталазин, цинолін, бензотіофен, і бензофуран. Інші гетероарильні групи включають групи, що містять від 5 до 8 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, такі як-от пірол, піридин, імідазол, піразол, триазол, піразин, піримідин, піридазин, триазин (1,2,3-, 1,2, 4- і 1,3,5-ізомери), тіофен, фуран, тіазол, ізотіазол, оксазол і ізоксазол. Деякі інші гетероарильні групи включають групи, що містять від 9 до 12 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, такі як-от індол, ізоіндол, хінолін, ізохінолін, хіноксалін, хіназолін, фталазин, цинолін, бензотіофен, бензофуран і біпіридин. Проте інші гетероарильні групи включають групи, що містять від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 2 гетероатомів у кільці, включаючи N, O або S, такі як-от пірол, піридин, імідазол, піразол, піразин, піримідин, піридазин, тіофен, фуран, тіазол, ізотіазол, оксазол і ізооксазол.

[0103] Деякі гетероарильні групи включають від 5 до 10 членів кільця і лише гетероатоми азоту, такі як-от пірол, піридин, імідазол, піразол, триазол, піразин, піримідин, піридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- і 1,3,5-ізомери), індол, ізоіндол, хінолін, ізохінолін, хіноксалін, хіназолін, фталазин і цинолін. Інші гетероарильні групи включають від 5 до 10 членів кільця і тільки гетероатоми кисню, такі як-от фуран і бензофуран. Деякі інші гетероарильні групи містять від 5 до 10 членів кільця і лише гетероатоми сірки, такі як-от тіофен і бензотіофен. Проте інші гетероарильні групи включають від 5 до 10 членів кільця і щонайменше два гетероатоми, такі як-от імідазол, піразол, триазол, піразин, піримідин, піридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- і 1,3,5-ізомери), тіазол, ізотіазол, оксазол, ізоксазол, хіноксалін, хіназолін, фталазин і цинолін.

[0104] "Гетероатоми" відносяться до O, S або N.

[0105] "Сіль" відноситься до кислотних або основних солей сполук, які використовуються в способах цього винаходу. Ілюстративними прикладами фармацевтично прийнятних солей є солі мінеральних кислот (соляної кислоти, бромистоводневої кислоти, фосфорної кислоти тощо), солі органічних кислот (оцтової кислоти, пропіонової кислоти, глутамінової кислоти, лимонної кислоти тощо) і солі четвертинного амонію (метилйодид, етилйодид тощо). Зрозуміло, що фармацевтично прийнятні солі нетоксичні. Додаткову інформацію про відповідні фармацевтично прийнятні солі можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, яке включено сюди шляхом посилання.

[0106] Термін "ізомери" означає сполуки з однаковою хімічною формулою, але структурно відмінні.

[0107] "Таутомер" відноситься до одного з двох або більше структурних ізомерів, які існують у рівновазі і які легко перетворюються з однієї форми на іншу.

[0108] Описи сполук цього винаходу обмежені принципами хімічного зв'язку, відомими фахівцям у цій галузі. Відповідно, якщо група може бути заміщена одним або декількома замісниками, такі заміни вибираються так, щоб відповідати принципам хімічного зв'язку і утворювати сполуки, які по сутті не є нестабільними – і/або були б відомі звичайному фахівцю в цій галузі, імовірно, буде нестабільним в умовах навколишнього середовища, таких як водні, нейтральні або фізіологічні умови.

[0109] Нестероїдні сполуки SGRM включають SGRM, що мають злитий азадекаліновий остов, гетероарилкетоновий злитий азадекаліновий остов і октагідрозлитий азадекаліновий остов. Приклади модуляторів глюкокортикоїдних рецепторів, які мають злитий азадекаліновий остов, включають описані в патентах US № 7928237 і № 8461172. Приклади модуляторів глюкокортикоїдних рецепторів, що мають остов азадекаліну, злитого з гетероарилкетоном, включають описані в патенті US № 8,859,774. Приклади модуляторів глюкокортикоїдних рецепторів, що мають октагідрозлитий азадекаліновий остов, включають описані в патенті US № 10,047,082.

[0110] "Фармацевтично прийнятний наповнювач" і "фармацевтично прийнятний носій" стосуються речовини, яка сприяє введенню активного агента суб'єкту і його поглинанню суб'єктом і може бути включена до композицій цього винаходу, не спричиняючи значного несприятливого токсикологічного впливу на пацієнта. Використовувані в цьому документі, ці терміни призначені для включення будь-яких розчинників, дисперсійних середовищ, покриттів, антибактеріальних і протигрибкових агентів, антиоксидантів, ізотоніків і агентів, які сповільнюють всмоктування, і тому подібного, сумісного з фармацевтичним введенням. Необмежувальні приклади фармацевтично прийнятних допоміжних речовин включають воду, NaCl, звичайні сольові розчини, лактат Рінгера, звичайну сахарозу, звичайну глюкозу, зв'язувальні речовини, наповнювачі, дезінтегранти, інкапсулюючі агенти, пластифікатори, мастила, покриття, підсолоджувачі, ароматизатори і барвники, і їм подібне. Фахівцю в цій галузі буде ясно, що інші фармацевтичні наповнювачі є корисними в цьому винаході. Застосування таких середовищ і агентів для фармацевтично активних речовин добре відомо в цій галузі. За винятком тих випадків, коли будь-які звичайні середовища або агенти несумісні з активною сполукою, передбачається їх використання в композиціях. Додаткові активні сполуки також можуть бути включені в композиції. Фахівцю в цій галузі буде ясно, що інші фармацевтичні наповнювачі є корисними в цьому винаході.

[0111] Тут описані способи лікування пухлин ACC у пацієнтів з надлишком кортизолу шляхом лікування комбінацією лікування SGRM і лікування інгібітором контрольної точки антитіл. У варіантах застосування рак є чутливим до інгібітора контрольної точки раком. У варіантах застосування рак, чутливий до інгібітора контрольної точки, а також є раком GR+.

Діагностика раку

[0112] Дані способи спрямовані на лікування пацієнтів, які страждають адренокортикальною карциномою (ACC). Ракові захворювання характеризуються неконтрольованим ростом і/або поширенням аномальних клітин. Зазвичай береться біопсія, а клітина або тканина від біопсії досліджується під мікроскопом, щоб підтвердити підозрюваний стан. В деяких випадках для підтвердження діагнозу потрібно провести додаткові тести клітинних білків, ДНК і РНК.

Виявлення раку, чутливого до інгібітора контрольної точки

[0113] В деяких варіантах застосування винаходу використовуються способи для лікування пацієнтів, які страждають принаймні на один чутливий до інгібітора контрольної точки рак. Ракові захворювання, чутливі до інгібіторів контрольних точок, це ті, які реагують на інгібітори контрольних точок, тобто введення одного або кількох інгібіторів контрольних точок може зменшити навантаження на пухлину ACC або досягти сприятливих або бажаних клінічних результатів, пов'язаних із покращенням раку. Наприклад, введення інгібітора контрольної точки може призвести до одного або кількох із такого: зменшення кількості ракових клітин; зменшення розміру пухлини; інгібування (тобто певною мірою уповільнення і/або припинення) інфільтрації ракових клітин у периферичні органи; інгібування (тобто певною мірою уповільнення і/або зупинку) метастазування пухлини; пригнічення, певною мірою, росту пухлини; і/або полегшення певною мірою одного або більше симптомів, пов'язаних з розладом; зменшення розмірів пухлини; зменшення симптомів захворювання; підвищення якості життя хворих; зменшення дози інших препаратів, необхідних для лікування захворювання; затримка прогресування захворювання; і/або продовження виживання пацієнтів.

[0114] Чутливі до інгібіторів контрольних точок пухлини часто мають високу експресію лігандів, наприклад, PD-L1 або B7, які зв'язуються з білками контрольних точок, PD-1 або CTLA-4 відповідно. Ці взаємодії пригнічують імунну відповідь проти клітин пухлини. На додаток до ACC, необмежувальні приклади чутливих до інгібіторів контрольних точок пухлин включають рак легенів, рак печінки, рак яєчників, рак шийки матки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак товстої кишки, рак молочної залози, гліому, карциному нирки, рак шлунку, рак стравоходу, плоскоклітинний рак ротової порожнини, рак голови/шиї, меланому, саркому, нирково-клітинну пухлину, гепатоцелюлярну пухлину, гліобластому, нейроендокринну пухлину, рак сечового міхура, рак підшлункової залози, рак жовчного міхура, рак шлунку, рак простати, рак ендометрію, рак щитовидної залози і мезотеліому.

Інгібітори контрольних точок

[0115] Розкритий тут спосіб використовує, щонайменше один SGRM в комбінації із, щонайменше одним інгібітором контрольної точки для лікування раку. В деяких варіантах застосування інгібітор контрольної точки є антитілом ("CIA") проти, принаймні одного білка контрольної точки. В деяких варіантах застосування інгібітор контрольної точки являє собою малу молекулу, небілкову сполуку ("CIC"), яка блокує шлях імуносупресії, індукований одним або кількома білками контрольної точки.

Антитіла до інгібіторів контрольних точок ("CIA", а також "інгібітори контрольних точок антитіл")

[0116] В одному варіанті здійснення спосіб лікування раку включає введення SGRM у поєднанні з антитілом-інгібітором контрольної точки. Таке антитіло може блокувати імуносупресивну активність білка контрольної точки. Деякі такі антитіла вже показали свою ефективність у лікуванні раку, наприклад, антитіла проти PD-1, CTLA4 і PD-L1.

[0117] Антитіла анти-PD-1 використовувалися для лікування меланоми, недрібноклітинного раку легенів, раку сечового міхура, раку передміхурової залози, колоректального раку, раку голови і шиї, потрійного негативного раку молочної залози, лейкемії, лімфоми і нирково-клітинного раку. Приклади антитіл анти-PD-1 включають пембролізумаб (раніше ламбролізумаб; MK-3475, MERCK), ніволумаб (BMS-936558, BRISTOL-MYERS SQUIBB), AMP-224 (MERCK) і піділізумаб (CT-011, CURETECH LTD.).

[0118] Антитіла анти-PD-L1 використовувалися для лікування недрібноклітинного раку легенів, меланоми, колоректального раку, нирково-клітинного раку, раку підшлункової залози, раку шлунку, раку яєчників, раку молочної залози і гематологічних злоякісних новоутворень. Приклади антитіл анти-PD-L1 включають MDX-1105 (MEDAREX), MEDI4736 (MEDIMMUNE), атезолізумаб (MPDL3280A; GENENTECH), дурвалумаб (AstraZeneca) і BMS-936559 (BRISTOL-MYERS SQUIBB).

Анти-CTLA4 антитіла використовувалися в клінічних випробуваннях для лікування меланоми, раку простати, дрібноклітинного раку легенів, недрібноклітинного раку легенів. Важливою особливістю анти-CTL4A є кінетика протипухлинного ефекту з періодом затримки до 6 місяців після початкового лікування, необхідним для фізіологічної відповіді. В деяких випадках пухлини можуть фактично збільшуватися в розмірах після початку лікування, перш ніж можна помітити зменшення (Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264). Приклади анти-CTLA4 CIA включають іпілімумаб (Bristol-Myers Squibb) і тремелімумаб (PFIZER).

[0119] CIA проти інших білків контрольних точок, таких як, наприклад, LAG-3 (ген активації лімфоцитів-3), B7-H3 (B7 гомолог білок 3), B7-H4 (гомолог B7 білок 4), TIM-3 (T-клітинний імуноглобулін і муциновий домен-3), CD160, CD244, VISTA (V-домен Ig супресор активації T-клітин), TIGIT (T-клітинний імуноглобулін і домен ITIM) і BTLA (B і T-клітинний атенюатор лімфоцитів) також можна використовувати в комбінації з SGRM, описаними тут, для лікування раку. Наприклад, антитіла, які пригнічують LAG-3, включають IMP321/Eftilagimod alpha (Immutep), Relatlimab (BMS-986016, Bristol Myers Squibb (BMS)), LAG525 (Novartis) і MK-4280 (Merck). Антитіла, які пригнічують B7-H3, включають еноблітузумаб /MGA271 (MacroGenics), MGD009e (MacroGenics), 131I-8H9 /омбуртамаб (Y-mAbs) і 124I-8H9 /omburtamab (Y-mAbs). Антитіла, які інгібують TIM-3, включають LY3321367 (також відомий як LY332; Eli Lilly and Company), TSR-022 (Tesaro), MBG453 (Novartis), Sym023 (Symphogen), INCAGN2390 (Incyte), BMS-986258 (BMS), RO7121661 (Roche) і SHR-1702 (Jiangsu HengRui); LY3321367, наприклад, показав багатообіцяючі результати в ранніх клінічних випробуваннях, у тому числі при використанні в комбінації з інгібіторами контрольних точок PD-L1. Антитіла, які пригнічують VISTA, включають JNJ-61610588 (Johnson & Johnson) і CA-170d (Curis). Антитіла, які пригнічують TIGIT, включають MK-7684 (Merck), Tiragolumab/MTIG7192A/RG-6058 (Genentech), Etigilimab /OMP-313 M32 (OncoMed), BMS-986207 (BMS), AB-154 (Arcus Biosciences) і ASP-8374 (Potenza).

[0120] CIA, які використовуються в цьому описі, можуть бути комбінацією різних CIA, особливо якщо цільові білки контрольних точок, наприклад, PD-1 і CTLA4, пригнічують імунну відповідь через різні сигнальні шляхи. Таким чином, комбінація CIA проти будь-якого з білків контрольних точок або один CIA проти обох білків контрольних точок може забезпечити посилену імунну відповідь.

Одержання CIA

[0121] CIA можна розробити з використанням методів, добре відомим в цій галузі. Див., наприклад, Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975) і Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Моноклональні антитіла можуть бути одержані шляхом ін'єкції мишам композиції, яка містить антиген, наприклад контрольний білок або його епітоп, видалений з селезінки для одержання B-лімфоцитів, злиття B-лімфоцитів з клітинами мієломи для одержання гібридом, клонування гібридом, відбір позитивних клонів, які виробляють антитіла до антигену, культивування клонів, які виробляють антитіла до антигену і виділення антитіл із гібридомних культур.

[0122] Одержані моноклональні антитіла можна виділити і очистити з культур гібридом з допомогою різноманітних добре відомих методик. Такі методи виділення включають афінну хроматографію з сефарозою протеїну-A, ексклюзійну хроматографію і іонообмінну

хроматографію. Див., наприклад, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 pages 2.9.1-2.9.3. Також див. Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992). Після первинного виведення антитіл до білка контрольної точки антитіла можна секвенувати і згодом одержувати за допомоги рекомбінантних методів. Гуманізація і химеризація мишачих антитіл і фрагментів антитіл добре відомі фахівцям в цій галузі. Див., наприклад, Leung et al. Hybridoma 13:469 (1994); US20140099254 A1.

[0123] Людські антитіла можна виробляти з використанням трансгенних мишей, які були генетично сконструйовані для виробництва специфічних людських антитіл у відповідь на антигенний виклик з використанням білка контрольної точки. Див. Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994). Людські антитіла проти білка контрольної точки також можна сконструювати методами генетичної або хромосомної трансфекції, технологією фагового дисплея або активованими in vitro B-клітинами. Див., наприклад, McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552-553; U.S. Pat. № 5, 567,610 і № 5, 229,275.

Модифікація CIA

[0124] CIA також можуть бути створені шляхом введення консервативних модифікацій відносно існуючих CIA. Наприклад, модифікована CIA може включати варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів і/або область Fc, які є гомологічними доповнювачами антитіла, одержаного вище. Модифіковане CIA, яке можна використовувати для описаного тут способу, має зберігати бажані функціональні властивості здатності блокувати сигнальний шлях контрольної точки.

[0125] CIA також можуть бути одержані шляхом зміни сайтів модифікації білка. Наприклад, сайти глікозилювання антитіла можуть бути змінені для одержання антитіла без глікозилювання, і тому модифіковані таким чином CIA зазвичай мають підвищену спорідненість антитіла до антигену. Антитіла також можна пегілювати шляхом взаємодії з поліетиленгліколем (PEG) в умовах, за яких одна або більше груп PEG приєднуються до антитіла. Пегілювання може збільшити біологічний період напіврозпаду антитіла. Антитіла з такими модифікаціями також можна використовувати в комбінації з селективним GR модулятором, описаним у цьому документі, за умови, що він зберігає бажані функціональні властивості блокування шляхів контрольних точок.

iii. Оцінка функціональних властивостей потенційних інгібіторів контрольних точок

[0126] Низка добре відомих аналізів може бути використана для оцінки того, чи є кандидат, тобто антитіло, створене шляхом імунізації тварини антигеном, яке містить білок контрольної точки, епітоп білка контрольної точки або тестову сполуку з комбінаторних бібліотек, як описано вище, є інгібітором контрольної точки антитіла. Необмежуючі типові аналізи включають аналізи зв'язування, такі як-от ферментні імуносорбентні аналізи (ELISA), радіоімунні аналізи (RIA), аналіз клітинного сортування за допомогою флуоресценції (FACS), клітинні аналізи і аналізи in vivo.

Аналіз зв'язування

[0127] В одному варіанті здійснення аналіз є аналізом прямого зв'язування. Білок контрольної точки можна з'єднати з радіоізотопною або ферментативною міткою так, щоб зв'язування білка контрольної точки і кандидата можна було визначити шляхом виявлення міченого білка контрольної точки в комплексі. Наприклад, білок контрольної точки може бути помічений радіоізотопами 125I, 35S, 14C або 3H прямо або опосередковано, а радіоізотоп може бути виявлений шляхом прямого підрахунку радіовипромінювання або підрахунку сцинтиляцій. Визначення здатності кандидатів зв'язувати свій споріднений білок контрольної точки можна здійснити, наприклад, шляхом вимірювання прямого зв'язування. Альтернативно, білкові молекули контрольної точки можуть бути ферментативно помічені, наприклад, пероксидазою хрону, лужною фосфатазою або люциферазою, а зв'язування кандидатів з цільовим білком контрольної точки визначається шляхом перетворення відповідного субстрату на продукт.

[0128] Ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA) зазвичай використовується для оцінки специфічності зв'язування CIA-кандидата з цільовим білком контрольної точки. В типовому аналізі панелі для мікротитрування покривають білком контрольної точки шляхом покриття протягом ночі при 37˚C 5 мкг/мл білка контрольної точки. Зразки сироватки, які містять CIA-кандидатів, розводять у PBS, 5 % сироватки, 0,5 % Tween-20 і інкубують у лунках протягом 1 год. при кімнатній температурі з подальшим додаванням IgG Fc анти-людини і IgG F(ab') пероксидази хрону в тому самому розчиннику. Через 1 год. при кімнатній температурі активність ферменту оцінюють шляхом додавання субстрату ABTS (Sigma, St. Louis Mo.) і зчитують через 30 хв на 415-490 нм.

[0129] Кінетику зв'язування (наприклад, афінність зв'язування) кандидатів також можна оцінити за допомоги стандартних аналізів, відомих в цій галузі техніки, таких як-от аналіз Biacore (Biacore AB, Uppsala, Sweden). В одному прикладі аналізу очищений рекомбінантний білок контрольної точки людини ковалентно зв'язаний із чіпом CM5 (чіпом, покритим карбоксиметилдекстраном) через первинні аміни, використовуючи стандартну хімію зв'язування амінів і набір, наданий Biacore. Зв'язування вимірюють шляхом введення кандидатів в буфер HBS EP (надається компанією Biacore AB) в концентрації 267 нМ зі швидкістю потоку 50 мкл/хв. Протягом 3 хв спостерігали за кінетикою асоціації білок-кандидат контрольної точки, а за кінетикою дисоціації протягом 7 хв. Криві асоціації і дисоціації підганялись до моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 з допомогою оцінки програмного забезпечення BIA (Biacore AB). Щоб мінімізувати вплив авідності на оцінку констант зв'язування, для підгонки використовується лише початковий сегмент даних, який відповідає фазам асоціації і дисоціації. Можна виміряти значення взаємодії KD, Kon і Koff. Переважні інгібітори контрольної точки можуть зв'язуватися зі своїм цільовим білком контрольної точки з Kd 1×10-7 М або менше.

[0130] Для білків контрольної точки, які блокують імунні відповіді шляхом зв'язування з лігандом, можуть бути використані додаткові аналізи зв'язування, щоб перевірити здатність кандидата блокувати зв'язування лігандів з білком контрольної точки. В одному прикладі аналізу проточна цитометрія використовується для перевірки блокування зв'язування ліганду (наприклад, PD-L1) з білком контрольної точки (наприклад, PD-1), експресованим на трансфікованих клітинах CHO. До суспензії клітин, яка експресують білок контрольної точки, додають різні концентрації кандидата і інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Незв'язаний інгібітор змивають, а FITC-мічений білок-ліганд додають у пробірки і інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Аналіз FACS виконується з допомогою проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Каліфорнія). Середня інтенсивність флуоресценції (MFI) фарбування клітин вказує на кількість ліганду, зв'язаного з білками контрольної точки. Знижений MFI в зразку, до якого додано кандидат, вказує на те, що кандидат є ефективним у блокуванні зв'язування ліганду з цільовим білком контрольної точки.

[0131] Аналіз зв'язування з гомогенною флуоресценцією з роздільною здатністю в часі (HTRF), такий як описаний у публікації PCT WO 2015034820, також можна використовувати для аналізу здатності кандидата блокувати взаємодію білка-ліганду контрольної точки. В одному варіанті здійснення CIC, які використовуються в способі, можуть інгібувати взаємодію PD-1/PD-L1 зі значеннями IC50 до 10 пМ або менше, наприклад, 0,01-10 пМ, переважно 1 пМ або менше, наприклад, 0,01-1 пМ, як виміряно з допомогою аналізу зв'язування гомогенної флуоресценції з роздільною здатністю в часі (HTRF).

Клітинний аналіз

[0132] В іншому варіанті здійснення аналіз для оцінки того, чи є кандидат інгібітором контрольної точки антитіла, є клітинний аналіз. Тест на змішану реакцію лімфоцитів (MLR), який описаний в патенті US № 8008449, зазвичай використовується для вимірювання проліферації Т-клітин, продукувати IL-2 і/або IFN-Y. В одному прикладі аналізу Т-клітини людини очищають від PBMC з допомогою колонки для збагачення людських CD4+ Т-клітин (системи R&D). Кандидат додають до кількох культур Т-клітин в різних концентраціях. Клітини культивують протягом 5 діб при 37 °C і з кожної культури беруть 100 мкл середовища для вимірювання цитокінів. Рівні IFN-гамма і інших цитокінів вимірюють за допомоги наборів OptEIA ELISA (BD Biosciences). Клітини мітять 3H-тимідином, культивують ще 18 год. і аналізують на клітинну проліферацію. Результати, які показують, що порівняно з контролем культура, яка містить кандидат, показує підвищену проліферацію Т-клітин, підвищене виробництво IL-2 і/або IFN-гамма, які вказують на те, що кандидат є ефективним у блокуванні інгібування білком контрольної точки імунної відповіді Т-клітин.

Аналізи in vivo

[0133] В іншому варіанті здійснення аналізом, який використовується для оцінки того, чи є кандидат інгібітором контрольної точки антитіла, є аналіз in vivo. В одному прикладі аналізу самок мишей AJ віком 6-8 тижнів (Harlan Laboratories) рандомізують за вагою на 6 груп. Мишам імплантують підшкірно в правий бік 2×106 клітин фібросаркоми SA1/N, розчинених у 200 мкл середовища DMEM в день 0. Мишей обробляють PBS-носієм або кандидатом у наперед визначеній дозі. Тваринам вводять внутрішньоочеревинну дозу приблизно 200 мкл PBS, яка містить кандидат або носій, на 1, 4, 8 і 11 доби. Протягом приблизно 6 тижнів мишей двічі на тиждень спостерігали за ростом пухлини. З допомогою електронного штангенциркуля вимірюють пухлини в трьох вимірах (висота × ширина × довжина) і обчислюють об'єм пухлини. Мишей піддають евтаназії, коли пухлини досягають кінцевої точки пухлини (1500 мм3) або миші показують більше ніж 15 % втрати ваги. Результат, який показує, що повільніший ріст пухлини в

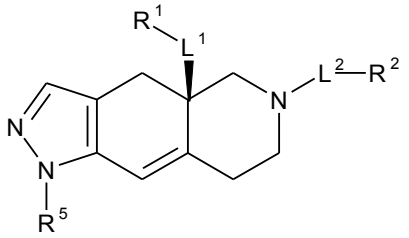
групі кандидатів, які одержували лікування, порівняно з контрольною групою, або довший середній час для досягнення кінцевого об'єму пухлини (1500 мм3) є ознакою того, що кандидат має активність у пригніченні росту раку.

Модулятори глюкокортикоїдних рецепторів (GRM)

[0134] Як правило, лікування карциноми кори надниркових залоз (ACC) у пацієнтів з надлишком глюкокортикоїдів можна забезпечити шляхом введення ефективної кількості селективного модулятора глюкокортикоїдних рецепторів (SGRM), який має конденсовану структуру азадекаліну, гетероарилкетонну конденсовану структуру азадекаліну або октадроконденсовану структуру азадекаліну і інгібітор контрольної точки антитіл. У варіантах застосування інгібітор контрольної точки антитіла ефективний проти клітин і пухлин експресує один або більше антигенів PD-1, CTLA-4, PD-L1 або PD-L2. У варіантах застосування також можна вводити хіміотерапевтичний засіб проти раку. Хіміотерапевтичний агент проти раку може бути, наприклад, обраний із таксанів, алкілуючих агентів, інгібіторів топоізомерази, агентів, які індукують стрес ендоплазматичного ретикулуму, антиметаболітів, інгібіторів мітозу і їх комбінацій.

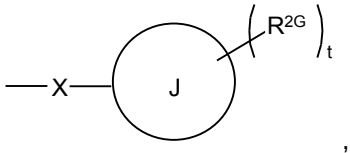
[0135] Сполуки селективних модуляторів глюкокортикоїдних рецепторів (SGRM) включають сполуки, які містять структуру азадекаліну, конденсованого з гетероарилкетонами (яку також можна назвати остовом азадекаліну, конденсованого з гетероарилкетонами). Зразкові сполуки SGRM, які містять структуру азадекаліну, конденсованого з гетероарилкетоном, включають описані в патенті US № 8859774; у патенті US № 9,273,047; в патенті US № 9,707,223; і в патенті US № 9,956,216. Всі патенти, патентні публікації і патентні заявки, розкриті в цьому документі, повністю включені в цей документ шляхом посилання.

[0136] В деяких випадках остовом GRM є конденсований азадекалін. В деяких випадках GRM має конденсований азадекаліновий остов є SGRM і може бути GRA або SGRA. В деяких випадках конденсований азадекалін є сполукою, яка має таку формулу:



,

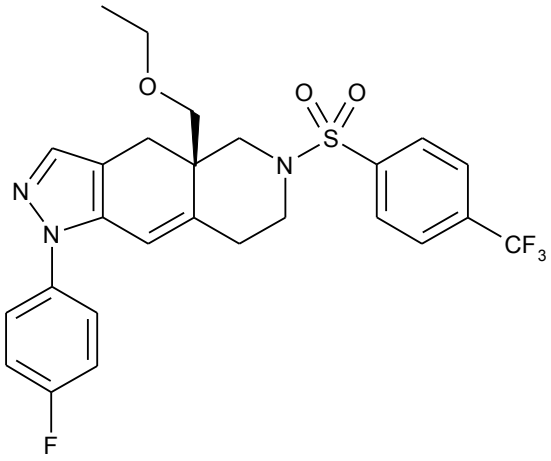
де L1 і L2 є членами, незалежно вибраними із зв'язку і незаміщеного алкілену; R1 є членом, вибраним із незаміщеного алкілу, незаміщеного гетероалкілу, незаміщеного гетероциклоалкілу, -OR1A, NR1CR1D, -C(O)NR1CR1D і -C(O)OR1A, в якому R1A є членом, вибраним із водню, незаміщеного алкілу і незаміщеного гетероалкілу; R1C і R1D є членами, незалежно вибраними з незаміщеного алкілу і незаміщеного гетероалкілу, і необов'язково з'єднані з утворенням незаміщеного кільця з атомом азоту, до якого вони приєднані, причому зазначене кільце необов'язково містить додатковий атом азоту в кільці. R2 має формулу:



,

де R2G є членом, вибраним із водню, галогену, незаміщеного алкилу, незаміщеного гетероалкілу, незаміщеного циклоалкілу, незаміщеного гетероциклоалкілу, -CN і -CF3; J є фенілом; t є цілим числом від 0 до 5; X являє собою -S(O2)-; і R5 являє собою феніл, необов'язково заміщений 1-5 групами з R5A, де R5A являє собою член, вибраний з водню, галогену, -OR5A1, S(O2)NR5A2R5A3, -CN і незаміщеного алкілу, а R5A1 являє собою член, вибраний з водню і незаміщеного алкілу, а R5A2 і R5A3 є членами, незалежно вибраними з водню і незаміщеного алкілу, або їх солей і ізомерів. Приклади таких сполук розкриті в US 7,928,237 і US 8,461,172 обидва з яких є патентами включеними повністю сюди шляхом посилання.

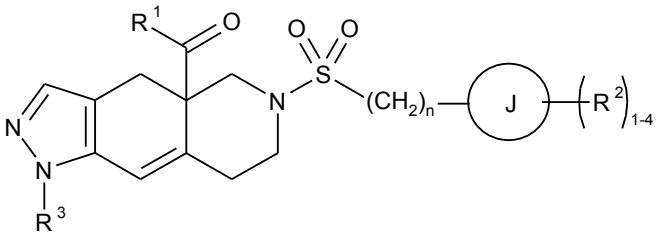
[0137] У варіантах реалізації конденсований азадекалін SGRM є CORT108297, тобто (R)-(4a-етоксиметил-1-(4-фторфеніл)-6-(4-трифторметил-бензолсульфоніл)-4,4a,5,6,7,8-гексагідро-1H, 1,2,6-тріаза -циклопента[b]нафталін, який має таку структуру:



.

[0138] В деяких випадках GRM остовом є конденсований гетероарилкетоновий азадекалін або октагідро конденсований азадекалін. В деяких випадках GRM мають конденсований гетероарилкетоновий азадекалін або конденсований октагідро азадекаліновий остов є SGRM і може бути GRA або SGRA.

[0139] Зразкові GRM, які містять структуру азадекаліну, конденсованого з гетероарилкетоном, включають ті, що описані в патенті US 8 859 774, які можуть бути одержані, як описано в ньому, і які, таким чином, включені в цей документ повністю. Такі зразкові GRMs можуть бути SGRMs. В деяких випадках GRM, які містять структуру азадекаліну, конденсованого з гетероарилкетоном, має таку структуру:



в якій

R1 являє собою гетероарильне кільце, яке містить від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, кожен незалежно вибраний із групи, яка складається з N, O і S, необов'язково заміщених 1-4 групами, кожна незалежно вибрана з R1a;

кожен R1a незалежно обраний із групи, яка складається з водню, C1-6 алкілу, галогену, C1-6 галогеналкілу, C1-6 алкокси, C1-6 галоалкокси, -CN, N-оксиду, C3-8 циклоалкілу і C3-8 гетероциклоалкілу;

кільце J вибрано з групи, яка складається з циклоалкільного кільця, гетероциклоалкільного кільця, арильного кільця і гетероарильного кільця, в якому гетероциклоалкільне і гетероарильне кільця мають від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, кожен незалежно вибраних із групи, яка складається з N, O і S;

кожен R2 незалежно обраний із групи, яка складається з водню, C1-6 алкілу, галогену, C1-6 галогеналкілу, C1-6 алкокси, C1-6 галоалкокси, C1-6 алкіл-C1-6 алкокси, -CN, -OH, -NR2aR2b, -C(O)R2a, -C(O)OR2a, -C(O)NR2aR2b, -SR2a, -S(O)R2a, -S(O)2R2a, C3-8 циклоалкіл і C3-8 гетероциклоалкіл, причому гетероциклоалкільні групи необов'язково заміщені 1-4 групами R2c;

альтернативно, дві групи R2, пов'язані з тим самим вуглецем, об'єднуються з утворенням оксогрупи (=O);

альтернативно, дві групи R2 об'єднуються з утворенням гетероциклоалкільного кільця, яке містить від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, кожен незалежно вибраних із групи, яка складається з N, O і S, причому гетероциклоалкільне кільце необов'язково заміщене від 1 до 3 групами R2d;

R2a і R2b, кожен незалежно, вибирають із групи, яка складається з водню і C1-6 алкілу;

кожен R2c незалежно обраний із групи, яка складається з водню, галогену, гідрокси, C1-6 алкокси, C1-6 галоалкокси, -CN і -NR2aR2b;

кожен R2d незалежно вибирається з групи, яка складається з водню і C1-6 алкілу, або дві групи R2d, приєднані до одного кільцевого атома, об'єднуються з утворенням (=O);

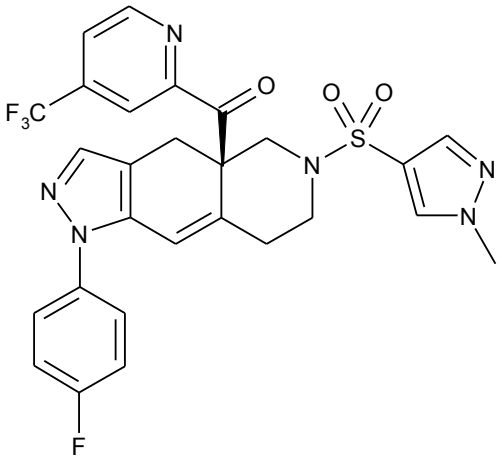
R3 обраний із групи, яка складається з фенілу і піридилу, кожен необов'язково заміщений 1-4 групами R3a;

кожен R3a незалежно обраний із групи, яка складається з водню, галогену і C1-6 галогеналкілу; і

нижній індекс n – це ціле число від 0 до 3;

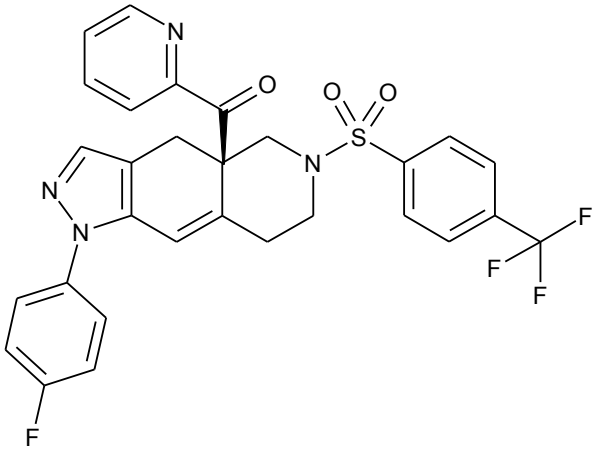
або їх солі і ізомери.

[0140] В деяких випадках гетероарилкетоновий конденсований азадекалін GRM є релакорилантом (CORT125134), тобто (R)-(1-(4-фторфеніл)-6-((1-метил-1H-піразол-4-їл)сульфоніл)-4,4a,5,6,7,8-гексагідро-1H-піразоло[3,4-g]ізохінолін-4a-їл)(4-(трифторметил)піридин-2-їл)метанон, який має таку структуру:



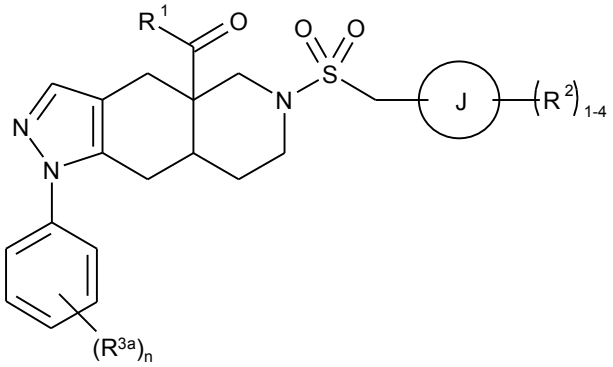
.

[0141] У варіантах застосування гетероарилкетоновий конденсований азадекалін SGRM є сполукою (R)-(1-(4-фторфеніл)-6-((4-(трифторметил)феніл)сульфоніл)-4,4a,5,6,7,8-гексагідро-1-H-піразоло P, 4-g]ізохінолін-4a-їл) (піридин-2-їл)метанон (під назвою "CORT113176"), який має таку структуру:



.

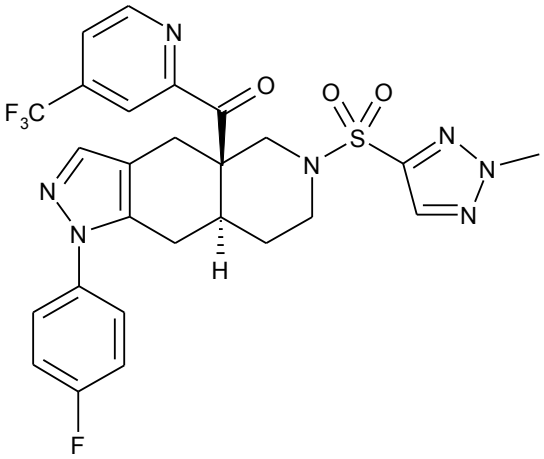
[0142] Приклади GRM, які містять октагідро конденсовану структуру азадекаліну, включають сполуки, описані в патенті US № 10 047 082, який повністю включено сюди шляхом посилання. У варіантах реалізації октагідро конденсований азадекалін GRM має формулу:



,

де R1 є гетероарильним кільцем, що містить від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, кожен незалежно вибраних із групи, яка складається з N, O і S, необов'язково заміщених 1-4 групами, кожна незалежно вибрана з R1a; кожен R1a незалежно обраний із групи, яка складається з водню, C1-6 алкілу, галогену, C1-6 галогеналкілу, C1-6 алкокси, C1-6 галогеналкокси, N-оксиду і C3-8 циклоалкілу; кільце J вибрано з групи, яка складається з арильного кільця і гетероарильного кільця, яке містить від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 4 гетероатомів, кожен незалежно вибраних із групи, яка складається з N, O і S; кожен R2 незалежно вибраний із групи, яка складається з водню, C1-6 алкілу, галогену, C1-6 галогеналкілу, C1-6 алкокси, C1-6 галогеналкокси, C1-6 алкіл-C1-6 алкокси, CN, OH, NR2aR2b, C(O)R2a, C(O)OR2a, C(O)NR2aR2b, SR2a, S(O)R2a, S(O)2R2a, C3-8 циклоалкіл і C3-8 гетероциклоалкіл, кожен з яких містить від 1 до 3 гетероатомів незалежно обраний із групи, яка складається з N, O і S; альтернативно, дві групи R2 на сусідніх атомах кільця об'єднуються з утворенням гетероциклоалкільного кільця, яке містить від 5 до 6 членів кільця і від 1 до 3 гетероатомів, кожен незалежно вибраних із групи, яка складається з N, O і S, причому гетероциклоалкільне кільце є необов'язково заміщене 1-3 групами R2c; R2a, R2b і R2c кожна незалежно обрана із групи, яка складається з водню і C1-6 алкілу; кожен R3a незалежно є галогеном; і нижній індекс n є цілим числом від 0 до 3, або їх солі і ізомери.

[0143] В деяких випадках октагідро конденсований азадекалін GRM є CORT125281, тобто ((4aR,8aS)-1-(4-фторфеніл)-6-((2-метил-2H-1,2,3-тріазол-4-їл))сульфоніл)-4,4a,5,6,7,8,8a,9-октагідро-1H-піразоло[3,4-g]ізохінолін-4a-їл)(4-(трифторметил)піридин-2-їл) метанон, який має таку структуру:



.

Ідентифікація селективних модуляторів глюкокортикоїдних рецепторів (SGRM)

[0144] Щоб визначити, чи є тестова сполука SGRM, сполуку спочатку піддають аналізам для вимірювання її здатності зв'язуватися з GR і інгібувати GR-опосередковану активність, які визначають, чи є сполука модулятором глюкокортикоїдного рецептора. Якщо підтверджено, що сполука є модулятором глюкокортикоїдного рецептора, яку потім піддають тесту на селективність, щоб визначити, чи може сполука специфічно зв'язуватися з GR порівняно з білками, які не є GR, такими як рецептор естрогену, рецептор прогестерону, рецептор андрогену, або мінералокортикоїдний рецептор. В одному варіанті здійснення SGRM

зв'язується з GR зі значно вищою спорідненістю, наприклад, принаймні в 10 разів вищою спорідненістю, ніж з не-GR білками. SGRM може демонструвати 100-кратну, 1000-кратну або більшу селективність для зв'язування з GR порівняно зі зв'язуванням з іншими білками.

Зв'язування

[0145] Здатність тестової сполуки зв'язуватися з глюкокортикоїдним рецептором можна виміряти за допомоги різноманітних аналізів, наприклад, шляхом скринінгу на здатність тестової сполуки конкурувати з лігандом глюкокортикоїдного рецептора, таким як дексаметазон, для зв'язування з глюкокортикоїдним рецептором. Фахівці в цій галузі техніки визнають, що існує ряд способів виконання таких конкурентних аналізів зв'язування. В деяких варіантах застосування глюкокортикоїдний рецептор попередньо інкубують із міченим лігандом глюкокортикоїдного рецептора, а потім контактують із тестовою сполукою. Цей тип конкурентного аналізу зв'язування також може називатися аналізом заміщення зв'язування. Зменшення кількості міченого ліганду, зв'язаного з глюкокортикоїдним рецептором, свідчить про те, що тестова сполука зв'язується з глюкокортикоїдним рецептором. В деяких випадках мічений ліганд є флуоресцентно міченою сполукою (наприклад, флуоресцентно міченим стероїдом або аналогом стероїду). Альтернативно, зв'язування тестової сполуки з глюкокортикоїдним рецептором можна виміряти безпосередньо з допомогою міченої тестової сполуки. Цей останній тип аналізу називається аналізом прямого зв'язування.

[0146] Як аналізи прямого зв'язування, так і аналізи конкурентного зв'язування можна використовувати в різних форматах. Формати можуть бути подібними до тих, що використовуються в імуноаналізі і аналізі зв'язування рецепторів. Для опису різних форматів аналізів зв'язування, включаючи аналізи конкурентного зв'язування і аналізи прямого зв'язування, див. Basic and Clinical Immunology 7th Edition (D. Stites and A. Terr ed.) 1991; Enzyme Immunoassay, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, " P. Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985), кожен з яких включений сюди шляхом посилання.

[0147] В твердофазних аналізах конкурентного зв'язування, наприклад, зразок сполуки може конкурувати з міченим аналітом за специфічні сайти зв'язування на зв'язувальному агенті, зв'язаному з твердою поверхнею. В цьому типі формату мічений аналіт може бути лігандом глюкокортикоїдного рецептора, а зв'язувальним агентом може бути глюкокортикоїдний рецептор, зв'язаний із твердою фазою. Альтернативно, мічений аналіт може бути міченим глюкокортикоїдним рецептором, а зв'язувальний агент може бути твердофазним лігандом глюкокортикоїдного рецептора. Концентрація міченого аналіту, зв'язаного з агентом захоплення, обернено пропорційна здатності тестової сполуки конкурувати в аналізі зв'язування.

[0148] Альтернативно, аналіз конкурентного зв'язування може бути проведений в рідкій фазі, і будь-який із різноманітних методів, відомих у цій галузі техніки, може бути використаний для відділення зв'язаного міченого білка від незв'язаного міченого білка. Наприклад, було розроблено декілька процедур для розрізнення зв'язаного ліганду і надлишку зв'язаного ліганду або між зв'язаною тестовою сполукою і надлишковою незв'язаною тестовою сполукою. Вони включають ідентифікацію зв'язаного комплексу шляхом седиментації в градієнтах сахарози, електрофорез у гелі або ізоелектричне фокусування в гелі; осадження комплексу рецептор-ліганд протамінсульфатом або адсорбцію на гідроксилапатиті; і видалення незв'язаних сполук або лігандів шляхом адсорбції на покритому декстраном деревному вугіллі (DCC) або зв'язування з іммобілізованим антитілом. Після поділу визначають кількість зв'язаного ліганду або тестової сполуки.

[0149] В якості альтернативи можна провести аналіз гомогенного зв'язування, у якому стадія розділення не потрібна. Наприклад, мітка на глюкокортикоїдному рецепторі може бути змінена шляхом зв'язування глюкокортикоїдного рецептора з його лігандом або тестовою сполукою. Ця зміна в міченому глюкокортикоїдному рецепторі призводить до зменшення або посилення сигналу, який випромінюється міткою, так що вимірювання мітки наприкінці аналізу зв'язування дозволяє виявити або кількісно визначити глюкокортикоїдний рецептор в зв'язаному стані. Можна використовувати різноманітні мітки. Компонент може бути позначений одним із кількох методів. Корисні радіоактивні мітки включають такі, що містять 3H, 125I, 35S, 14C або 32P. Корисні нерадіоактивні мітки включають такі, що містять флуорофори, хемілюмінесцентні агенти, фосфоресцентні агенти, електрохемілюмінесцентні агенти тощо. Флуоресцентні агенти особливо корисні в аналітичних методах, які використовуються для виявлення змін в структурі білка, таких як-от анізотропія флуоресценції і/або поляризована флуоресценції. Вибір мітки залежить від необхідної чутливості, легкості кон'югації із сполукою, вимог до стабільності і наявного обладнання. Для огляду різних систем маркування або створення сигналів, які можуть

бути використані, дивіться патент US № 4391904, який включений сюди шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Мітка може бути зв'язана прямо або опосередковано з бажаним компонентом аналізу відповідно до методів, добре відомих у цій галузі техніки. В деяких випадках тестова сполука контактує з GR за присутності флуоресцентно міченого ліганду (наприклад, стероїду або аналога стероїду) з відомою спорідненістю до GR, і кількість зв'язаного і вільного міченого ліганду оцінюється шляхом вимірювання поляризація флуоресценції міченого ліганду.

HepG2 аналіз тирозинамінотрансферази (TAT)

[0150] Сполуки, які продемонстрували бажану спорідненість зв'язування з GR, тестуються на їхню активність відносно інгібування опосередкованої GR активності. Сполуки, як правило, підлягають аналізу тирозинамінотрансферази (аналіз TAT), який оцінює здатність тестової сполуки інгібувати індукцію активності тирозинамінотрансферази дексаметазоном. Див. Приклад 1. Модулятори GR, які підходять для описаного тут способу, мають IC50 (половину максимальної концентрації інгібування) менше ніж 10 мікромолей. Інші аналізи, включаючи, але не обмежуються ними, такі, що описані нижче, також можуть бути застосовані для підтвердження GR модуляційної активності сполук.

Клітинні аналізи

[0151] Клітинний аналіз, який включає цілі клітини або клітинні фракції, які містять глюкокортикоїдні рецептори, також можна використовувати для аналізу зв'язування тестової сполуки або модуляції активності глюкокортикоїдного рецептора. Приклади типів клітин, які можна використовувати згідно зі способами винаходу, включають, наприклад, будь-які клітини ссавців, включаючи лейкоцити, такі як-от нейтрофіли, моноцити, макрофаги, еозинофіли, базофіли, тучні клітини і лімфоцити, такі як-от Т-клітини і В клітини, лейкемія клітини, клітини лімфоми Беркітта, клітини пухлини (включаючи клітини вірусу пухлини молочної залози миші), ендотеліальні клітини, фібробласти, клітини серця, м'язові клітини, клітини пухлини молочної залози, карциноми раку яєчників, карциноми шийки матки, гліобластоми, клітини печінки, клітини нирок і нейронні клітини, а також клітини грибів, у тому числі дріжджів. Клітини можуть бути первинними клітинами або пухлинними клітинами або іншими типами імортализованих клітинних ліній. Звичайно, глюкокортикоїдний рецептор може експресуватися в клітинах, які не експресують ендогенну версію глюкокортикоїдного рецептора.

[0152] В деяких випадках для скринінгу можна використовувати фрагменти глюкокортикоїдного рецептора, а також злиття білків. Якщо потрібні молекули, які конкурують за зв'язування з лігандами глюкокортикоїдного рецептора, використовувані фрагменти GR є фрагментами, здатними зв'язувати ліганди (наприклад, дексаметазон). Альтернативно, будь-який фрагмент GR можна використовувати як мішень для ідентифікації молекул, які зв'язують глюкокортикоїдний рецептор. Фрагменти глюкокортикоїдного рецептора можуть включати будь-який фрагмент, наприклад, щонайменше 20, 30, 40, 50 амінокислот аж до білка, який містить всі амінокислоти глюкокортикоїдного рецептора, окрім однієї.

[0153] В деяких варіантах застосування зниження передачі сигналів, викликане активацією глюкокортикоїдного рецептора, використовується для ідентифікації модуляторів глюкокортикоїдного рецептора. Сигнальну активність глюкокортикоїдного рецептора можна визначити різними способами. Наприклад, можна відстежувати подальші молекулярні події для визначення сигнальної активності. Подальші події включають активність або прояви, які виникають в результаті стимуляції глюкокортикоїдного рецептора. Приклади наступних подій, корисних у функціональній оцінці транскрипційної активації і антагонізму в незмінених клітинах, включають активацію ряду залежних від елемента відповіді на глюкокортикоїди (GRE) генів (PEPCK, тирозинамінотрансферази, ароматази). Крім того, можна використовувати специфічні типи клітин, сприйнятливі до активації GR, такі як-от експресія остеокальцину в остеобластах, яка знижується глюкокортикоїдами; первинні гепатоцити, які виявляють опосередковану глюкокортикоїдами регуляцію PEPCK і глюкозо-6-фосфату (G-6-Pase)). GRE-опосередкована експресія гена також була продемонстрована в трансфікованих клітинних лініях з використанням добре відомих GRE-регульованих послідовностей (наприклад, промотор вірусу пухлини молочної залози миші (MMTV), трансфікований перед конструкцією репортерного гена). Приклади корисних конструкцій репортерного гена включають люциферазу (luc), лужну фосфатазу (ALP) і хлорамфеніколацетилтрансферазу (CAT). Функціональна оцінка репресії транскрипції може бути проведена в клітинних лініях, таких як моноцити або фібробласти шкіри людини. Корисні функціональні аналізи включають такі, які вимірюють експресію IL-6, стимульовану IL-1beta; зниження регуляції колагенази, циклооксигенази-2 і різних хемокінів (MCP-1, RANTES); LPS стимулює вивільнення цитокінів, наприклад, TNFα; або експресію генів, регульованої факторами транскрипції NFkB або AP-1, в трансфікованих клітинних лініях.

[0154] Сполуки, які тестуються в цільноклітинних аналізах, також можуть бути протестовані в аналізі на цитотоксичність. Аналіз цитотоксичності використовується для визначення ступеня, до якого відчутний ефект зумовлений клітинними ефектами, не пов'язаними з глюкокортикоїдними рецепторами. В типовому варіанті здійснення аналіз цитотоксичності включає контактування конститутивно активної клітини з тестовою сполукою. Будь-яке зниження клітинної активності свідчить про цитотоксичну дію.

3) Додаткові аналізи

[0155] Додатковою ілюстрацією багатьох аналізів, які можна використовувати для ідентифікації композицій, які використовуються в способах винаходу, є аналізи, засновані на активності глюкокортикоїдів in vivo. Наприклад, можуть бути використані аналізи, які оцінюють здатність передбачуваного модулятора GR інгібувати поглинання 3H-тимідину в ДНК у клітинах, які стимулюються глюкокортикоїдами. Альтернативно, передбачуваний GR модулятор може доповнюватися 3H-дексаметазоном для зв'язування з гепатомою культурою тканини GR (див., наприклад, Choi, et al., Steroids 57:313-318, 1992). Як інший приклад можна використати здатність імовірного модулятора GR блокувати ядерне зв'язування комплексу 3H-дексаметазон-GR (Alexandrova et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 41:723-725, 1992). Для подальшої ідентифікації передбачуваних модуляторів GR також можна використовувати кінетичні аналізи, здатні розрізняти агоністи глюкокортикоїдів і модулятори за кінетикою зв'язування рецепторів (як описано в Jones, Biochem J. 204:721-729, 1982).

[0156] В іншому ілюстративному прикладі описаний аналіз Диуна (Daune) в, Molec. Pharm. 13:948-955, 1977; і в патенті U.S. 4386085, який можна використовувати для ідентифікації антиглюкокортикоїдної активності. Коротко, тимоцити адреналектомованих щурів інкубують у живильному середовищі, яке містить дексаметазон з тестовою сполукою (імовірний GR модулятор) в різних концентраціях. 3H-уридин додають до клітинної культури, яку далі інкубують, і вимірюють ступінь включення радіоактивної мітки в полінуклеотид. Агоністи глюкокортикоїдів зменшують кількість наявного 3H-уридину. Таким чином, GR модулятор протидіятиме цьому ефекту.

iii. Селективність

[0157] Вибрані вище GR модулятори потім підлягають аналізу на селективність, щоб визначити, чи є вони SGRM. Як правило, аналізи на селективність включають тестування сполуки, яка зв'язує глюкокортикоїдний рецептор in vitro, на ступінь зв'язування з неглюкокортикоїдними рецепторними білками. Дослідження селективності можна проводити in vitro або в клітинних системах, як описано вище. Зв'язування можна перевірити з будь-яким відповідним неглюкокортикоїдним рецепторним білком, включаючи антитіла, рецептори, ферменти тощо. В типовому варіанті здійснення білок, який не зв'язує глюкокортикоїдний рецептор, є рецептором клітинної поверхні або ядерним рецептором. В іншому зразковому варіанті здійснення винаходу неглюкокортикоїдний рецепторний білок є стероїдним рецептором, таким як рецептор естрогену, рецептор прогестерону, рецептор андрогену або рецептор мінералокортикоїду.

[0158] Селективність антагоніста на GR відносно MR можна виміряти з допомогою різноманітних аналізів, відомих фахівцям у цій галузі. Наприклад, специфічні антагоністи можна ідентифікувати шляхом вимірювання здатності антагоніста зв'язуватися з GR порівняно з MR (див., наприклад, патент US № 5606021; № 5696127; № 5,215,916; № 5,071,773). Такий аналіз можна виконати шляхом аналізу прямого зв'язува нння або шляхом оцінки конкурентного зв'язування з очищеним GR або MR в присутності відомого ліганду. В прикладі аналізу клітини, які стабільно експресують глюкокортикоїдний рецептор або мінералокортикоїдний рецептор (див., наприклад, патент US № 5606021), який при високих рівнях використовують як джерело очищеного рецептора. Потім безпосередньо вимірюють афінність ліганду до рецептора. Ті GR модулятори, які виявляють щонайменше у 10 разів, у 100 разів вищу спорідненість, часто у 1000 разів, до GR відносно MR, потім вибирають для використання в способах винаходу.

[0159] Аналіз на селективність також може включати аналіз здатності інгібувати опосередковану GR діяльність, але не активність, опосередковану MP. Одним із методів ідентифікації такого GR-специфічного модулятора є оцінка здатності антагоніста запобігати активації репортерних конструкцій за допомогою аналізів трансфекції (див., наприклад, Bocquel et al, J. Steroid Biochem Molec. Biol. 45:205-215, 1993; U.S. Pat. Nos. 5,606,021, 5,929,058). В прикладі аналізу трансфекції експресовану плазміду, яка кодує рецептор, і репортерну плазміду, яка містить репортерний ген, пов'язаний із рецептор-специфічними регуляторними елементами, спільно трансфікують у відповідні рецепторнегативні клітини-господарі. Потім трансфіковані клітини-хазяїни культивують у присутності і за відсутності гормону, такого як-от кортизол або його аналог, здатного активувати реагуючий на гормон промоторний/енхансерний

елемент репортерної плазміди. Потім трансфіковані і культивовані клітини-господарі контролюють на індукцію (тобто присутність) продукту послідовності репортерного гена. Нарешті, експресію і/або здатність до зв'язування стероїдів гормонального рецепторного білка (кодованого рецепторною послідовністю ДНК на експресійній плазміді і продукованого в трансфікованих і культивованих клітинах-господарях) вимірюють шляхом визначення активності репортерного гена за наявності і відсутності антагоніста. Антагоністичну активність сполуки можна визначити порівняно з відомими антагоністами рецепторів GR і MR (див., наприклад, патент US № 5,696,127). Потім ефективність обчислюється як відсоток максимальної відповіді, яка спостерігається для кожної сполуки відносно контрольної сполуки-антагоніста. Модулятори GR, які виявляють принаймні 100-кратну, часто 1000-кратну або більшу активність до GR відносно MR, PR або AR, потім вибирають для використання в методах, описаних у цьому документі.

Фармацевтичні композиції і застосування

і. Рецептури

[0160] У деяких варіантах застосування цей винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить фармацевтично прийнятний наповнювач і SGRM і фармацевтично прийнятний наповнювач і CIC або CIA.

[0161] Будь-які SGRM, CIC або CIA, описані в цьому документі, можуть бути складені разом із фармацевтично прийнятним носієм. Такі композиції можуть включати одне або комбінацію (наприклад, двох або більше різних) антитіл, або імунокон'югатів або біспецифічних молекул винаходу. Наприклад, фармацевтична композиція за винаходом може містити комбінацію антитіл (або імунокон'югатів або біспецифічних активаторів), які зв'язуються з різними епітопами на цільовому антигені або мають комплементарну активність.

[0162] У варіантах застосування цей винахід пропонує фармацевтичну композицію для лікування пацієнтів, які страждають на ACC і мають надлишок кортизолу, причому фармацевтична композиція включає фармацевтично прийнятний наповнювач і GRM. В деяких варіантах застосування фармацевтична композиція включає фармацевтично прийнятний ексципієнт і SGRM. В переважних варіантах застосування фармацевтична композиція включає фармацевтично прийнятний ексципієнт і нестеродіальний SGRM.

[0163] GRM і SGRM (як тут використовується, GRM і SGRM включають нестероїдні GRM і нестероїдні SGRM) можуть бути виготовлені і застосовані в широкому спектрі пероральних, парентеральних і місцевих дозованих форм. Пероральні препарати є переважними. Пероральні препарати включають таблетки, пігулки, порошок, драже, капсули, рідини, льодяники, гелі, сиропи, суспензії, глинисті суспензії тощо, придатні для прийому пацієнтом. GRM і SGRM також можна вводити шляхом ін'єкції, тобто внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, підшкірно, інтрадуоденально або внутрішньоочеревинно. Крім того, GRM і SGRM можна вводити шляхом інгаляції, наприклад, інтраназально. Крім того, GRM і SGRM можна вводити трансдермально. Відповідно, цей винахід також забезпечує фармацевтичні композиції, які містять фармацевтично прийнятний носій або наповнювач і GRM або SGRM.

[0164] Для приготування фармацевтичних композицій з GRM і SGRM фармацевтично прийнятні носії можуть бути твердими або рідкими. Тверді форми препаратів включають порошки, таблетки, пігулки, капсули, облатки, супозиторії і диспергувані гранули. Твердим носієм може бути одна або більше речовин, які також можуть діяти як розріджувачі, ароматизатори, зв'язувальні речовини, консерванти, розпушувачі таблеток або матеріал для інкапсуляції. Подробиці щодо методів складання і введення добре описані в науковій і патентній літературі, див., наприклад, останнє видання Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton PA ("Remington's").

[0165] В порошках носій являє собою дрібно подрібнену тверду речовину, яка знаходиться в суміші з дрібно подрібненим активним компонентом, GRM або SGRM. В таблетках активний компонент змішується з носієм, який має необхідні зв'язувальні властивості, у відповідних пропорціях і пресується до бажаної форми і розміру.

[0166] Порошки і таблетки переважно містять від 5 % або 10 % до 70 % активної сполуки. Придатними носіями є карбонат магнію, стеарат магнію, тальк, цукор, лактоза, пектин, декстрин, крохмаль, желатин, трагакант, метилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, низькоплавкий віск, какао-масло тощо. Термін "препарат" включає композицію активної сполуки з інкапсулюючим матеріалом в якості носія, яка забезпечує капсулу, в якій активний компонент з іншими носіями або без них оточений носієм, який, таким чином, пов'язаний з ним. Подібним чином включені льодяники і таблетки для розсмоктування. Таблетки, порошки, капсули, пігулки, облатки і льодяники можна використовувати як тверді лікарські форми, придатні для перорального введення.

[0167] Відповідними твердими наповнювачами є вуглеводні або білкові наповнювачі, які включають, але не обмежуються ними, цукри, включаючи лактозу, сахарозу, маніт або сорбіт; крохмаль від кукурудзи, пшениці, рису, картоплі або інших рослин; целюлозу, таку як метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза або натрійкарбоксиметилцелюлоза; і камеді, включаючи аравій і трагакант; а також білки, такі як-от желатин і колаген. За бажанням можна додати розпушувачі або солюбілізатори, такі як-от зшитий полівінілпіролідон, агар, альгінову кислоту або її сіль, таку як альгінат натрію.

[0168] Серцевини драже забезпечені відповідними покриттями, такими як концентровані розчини цукру, які також можуть містити гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, карбопол гель, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, розчини лаку і відповідні органічні розчинники або суміші розчинників. Барвники або пігменти можуть бути додані до покриттів таблеток або драже для ідентифікації продукту або для характеристики кількості активної сполуки (тобто дозування). Фармацевтичні препарати винаходу також можна застосовувати перорально, наприклад, з використанням капсул, виготовлених із желатину, а також м'яких герметичних капсул, виготовлених із желатину і покриття, такого як-от гліцерин або сорбіт. Капсули Push-fit можуть містити GR модулятор, змішаний із наповнювачем або зв'язувальними речовинами, такими як лактоза або крохмаль, мастильними речовинами, такими як-от тальк або стеарат магнію, і, необов'язково, стабілізаторами. В м'яких капсулах сполуки GR модулятори можуть бути розчинені або суспендовані у відповідних рідинах, таких як-от жирні олії, рідкий парафін або рідкий поліетиленгліколь зі стабілізаторами або без них.

[0169] Препарати в рідкій формі включають розчини, суспензії і емульсії, наприклад, воду або розчини вода/пропіленгліколь. Для парентерального введення рідкі препарати можна приготувати у вигляді розчину у водному розчині поліетиленгліколю.

[0170] Водні розчини, придатні для перорального застосування, можна приготувати шляхом розчинення активного компонента у воді і додавання відповідних барвників, ароматизаторів, стабілізаторів і загусників за бажанням. Водні суспензії, придатні для перорального застосування, можуть бути виготовлені диспергуванням тонко подрібненого активного компонента у воді з в'язким матеріалом, таким як-от природні або синтетичні камеді, смоли, метилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, альгінат натрію, полівінілпіролідон, камедь трагаканту і камедь акації, і диспергуючі або зволожуючі агенти, такі як-от природний фосфатид (наприклад, лецитин), продукт конденсації алкіленоксиду з жирною кислотою (наприклад, поліоксіетиленстеарат), продукт конденсації етиленоксиду з довголанцюговим аліфатичним спиртом (наприклад, гептадекаетилен оксицетанол), продукт конденсації етиленоксиду з частковим складним ефіром, одержаним із жирної кислоти і гекситолу (наприклад, моноолеат поліоксіетиленсорбітолу), або продукт конденсації етиленоксиду з частковим складним ефіром, одержаним із жирної кислоти і ангідриду гекситолу, (наприклад, поліоксиетиленсорбітан моноолеат). Водна суспензія також може містити один або більше консервантів, таких як-от етил або n-пропіл p-гідроксибензоат, один або більше барвників, один або більше ароматизаторів і один або більше підсолоджувачів, таких як сахароза, аспартам або сахарин. Осмолярність рецептури можна регулювати.

[0171] Також включені препарати в твердій формі, які незадовго до використання мають бути перетворені на препарати в рідкій формі для перорального введення. До таких рідких форм відносяться розчини, суспензії і емульсії. Ці препарати можуть містити, на додаток до активного компонента, барвники, ароматизатори, стабілізатори, буфери, штучні і природні підсолоджувачі, диспергатори, загусники, солюбілізатори тощо.

[0172] Масляні суспензії можна приготувати шляхом суспендування SGRM в рослинній олії, такій як-от арахісова олія, оливкова олія, кунжутна олія або кокосова олія, або в мінеральній олії, такій як-от рідкий парафін; або їх суміш. Масляні суспензії можуть містити загусник, такий як бджолиний віск, твердий парафін або цетиловий спирт. Підсолоджувачі можуть бути додані для забезпечення приємного перорального препарату, такі як-от гліцерин, сорбіт або сахароза. Ці рецептури можна зберегти шляхом додавання антиоксиданту, такого як аскорбінова кислота. Як приклад ін'єкційного масляного носія див. Minto, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102, 1997. Фармацевтичні рецептури винаходу також можуть бути у формі емульсій олія-у-воді. Масляна фаза може бути рослинною олією або мінеральною олією, описаними вище або їх сумішшю. Відповідні емульгуючі агенти включають природні камеді, такі як-от камедь акації і трагакантова камедь, природні фосфатиди, такі як-от соєвий лецитин, складні ефіри або неповні складні ефіри, одержані з жирних кислот і ангідридів гекситолу, такі як-от сорбітан моноолеат, і продукти конденсації цих речовин. часткові складні ефіри з етиленоксидом, такі як-от поліоксиетиленсорбітан моноолеат. Емульсія також може містити підсолоджувачі і

ароматизатори, у складі сиропів і еліксирів. Такі рецептури також можуть містити пом'якшувальний засіб, консервант або барвник.

[0173] У варіантах реалізації GRM і SGRM можна доставляти трансдермально, місцевим шляхом, у вигляді аплікаторів, розчинів, суспензій, емульсій, гелів, кремів, мазей, паст, желе, фарб, порошків і аерозолів.

[0174] GRM і SGRM також можна доставляти у вигляді мікросфер для повільного вивільнення в організмі. Наприклад, мікросфери можна вводити шляхом внутрішньошкірної ін'єкції мікросфер, які містять ліки, які повільно вивільняються підшкірою (див. Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995; як біологічно розкладані і ін'єкційні гелі (див., наприклад, Gao Pharm. Res. 12:857-863, 1995); або у вигляді мікросфер для перорального введення (див., наприклад, Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674, 1997). Як трансдермальний, так і внутрішньошкірний шляхи забезпечують постійну доставку протягом тижнів або місяців.

[0175] Фармацевтичні рецептури за винаходом можуть бути надані у вигляді солі і можуть бути утворені з багатьма кислотами, включаючи, але не обмежуючись ними соляну, сірчану, оцтову, молочну, винну, яблучну, янтарну тощо. Солі, як правило, краще розчиняються у водному або іншому протонному розчиннику, які є відповідними формами вільної основи. В інших випадках препарат може являти собою ліофілізований порошок з 1-50 мМ гістидину, 0,1 %-2 % сахарози, 2 %-7 % маніту в діапазоні pH від 4,5 до 5,5, який поєднується з буфером перед використанням.

[0176] В іншому варіанті здійснення рецептури за винаходом можна доставляти за допомоги ліпосом, які зливаються з клітинною мембраною або піддаються ендоцитозу, тобто з допомогою лігандів, приєднаних до ліпосоми або безпосередньо до олігонуклеотиду, який зв'язуються з білком поверхневої мембрани білкових рецепторів клітини, що призводить до ендоцитозу. Використовуючи ліпосоми, особливо якщо поверхня ліпосом несе ліганди, специфічні для клітин-мішеней, або іншим чином переважно спрямовані на певний орган, можна зосередити доставку модулятора GR в клітини-мішені in vivo. (Див., наприклад, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989).

[0177] Фармацевтичний препарат переважно є у формі одиничної дози. В такій формі препарат підрозділяється на одиничні дози, які містять відповідні кількості активного компонента, GRM або SGRM. Стандартна лікарська форма може бути упакованим препаратом, упаковка, яка містить окремі кількості препарату, такі як-от упаковані таблетки, капсули і порошки у флаконах або ампулах. Крім того, стандартна лікарська форма може являти собою капсулу, таблетку, облатку або льодяник, або це може бути відповідна кількість будь-якого з них у упакованій формі.

[0178] Кількість активного компонента в стандартній дозі препарату можна змінювати або регулювати від 0,1 мг до 10000 мг, більш типово від 1,0 мг до 6000 мг, найбільш типово від 50 мг до 500 мг. Відповідні дози також включають приблизно 1 мг, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 або 2000 мг, залежно від конкретного застосування і потужності активного компонента. Композиція може, за бажанням, також містити інші сумісні терапевтичні засоби.

[0179] Фармацевтичний препарат переважно є у формі одиничної дози. В такій формі препарат розділяється на одиничні дози, які містять відповідні кількості сполук і композицій цього винаходу. Стандартна лікарська форма може бути упакованим препаратом, упаковка, яка містить окремі кількості препарату, такі як-от упаковані таблетки, капсули і порошки у флаконах або ампулах. Крім того, стандартна лікарська форма може являти собою капсулу, таблетку, облатку або льодяник, або це може бути відповідна кількість будь-якого з них у упакованій формі.

[0180] GRM, включаючи SGRM, можна вводити перорально. Наприклад, GRM можна вводити у вигляді таблетки, капсули або рідкого складу, як описано тут. Альтернативно, GRM можна вводити шляхом парентерального введення. Наприклад, GRM можна вводити внутрішньовенно (наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії). Тут описані додаткові способи введення сполук, описаних у цьому документі, і їх фармацевтичних композицій або рецептур.

[0181] В деяких варіантах реалізації GRM вводять однією дозою. В інших варіантах застосування GRM вводять у вигляді більше однієї дози, наприклад, 2 дози, 3 дози, 4 дози, 5 доз, 6 доз, 7 доз і більше. В деяких випадках дози еквівалентні. В інших випадках дози різні. Дози можуть збільшуватися або зменшуватися протягом тривалості прийому. Кількість змінюватиметься відповідно до, наприклад, властивостей GRM і характеристик пацієнта.

[0182] Будь-яка відповідна доза GRM може бути використана в способах, описаних тут. Доза GRM, яку вводять, може становити щонайменше приблизно, наприклад, 100 міліграмів (мг) на

добу, приблизно 150 мг/добу, приблизно 200 мг/добу, приблизно 250 мг/добу, приблизно 300 мг/добу, приблизно 350 мг/добу, приблизно 400 мг/добу, приблизно 450 мг/добу, приблизно 500 мг/добу, приблизно 550 мг/добу, приблизно 600 мг/добу, приблизно 650 мг/добу, приблизно 700 мг/добу, приблизно 750 мг/добу приблизно 800 мг/добу, приблизно 850 мг/добу, приблизно 900 мг/добу, приблизно 950 мг/добу, приблизно 1000 мг/добу і більше.

[0183] В деяких випадках ефективна кількість GRM (наприклад, SGRM, такого як нестероїдний SGRM) становить добову дозу від 1 до 30 мг/кг/добу, де GRM вводять принаймні з одним хіміотерапевтичним засобом. В деяких варіантах застосування добова доза GRM становить 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 25 або 30 мг/кг/добу. В деяких випадках GRM вводиться протягом, щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 або 80 тижнів.

[0184] У варіантах застосування GRM вводять перорально. В деяких варіантах застосування GRM вводять, щонайменше однією дозою. Іншими словами, GRM можна вводити за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше доз. У варіантах застосування GRM вводять перорально за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше доз.

[0185] Суб'єкту можна вводити, щонайменше, одну дозу GRM за одну або більше доз протягом, наприклад, 2-48 год. В деяких варіантах реалізації GRM вводять у вигляді одноразової дози. В інших варіантах застосування GRM вводять у більш ніж в одній дозі, наприклад 2 дози, 3 дози, 4 дози, 5 доз або більше доз за 2-48 год., наприклад, за 2 год., 3 год., 4 год., 5 год., 6 год., 7 год., 8 год., 9 год., 10 год., 11 год., 12 год., 14 год., 16 год., 18 год., 20 год., 22 год., 24 год., 26 год., 28 год., 30 год., 32 год., 34 год., 36 год., 38 год., 40 год., 42 год., 44 год., 46 год. або 48 год. період. В деяких варіантах реалізації GRM вводять протягом 2-48 год., 2-36 год., 2-24 год., 2-12 год., 2-8 год., 8-12 год., 8-24 год., 8-36 год., 8-48 год., 9-36 год., 9-24 год., 9-20 год., 9-12 год., 12-48 год., 12-36 год., 12-24 год., 18-48 год., 18-36 год., 18-24 год., 24-36 год., 24-48 год., 36-48 год. або 42-48 год.

[0186] Одноразове або багаторазове введення композицій можна вводити залежно від дозування і частоти за потреби і за переносимості пацієнта. Рецептури повинні забезпечувати достатню кількість активного агента для ефективного лікування стану хвороби. Таким чином, в одному варіанті здійснення фармацевтична композиція для перорального введення GRM містить добову кількість від приблизно 0,01 до приблизно 150 мг на кілограм маси тіла на добу (мг/кг/добу). В деяких варіантах застосування добова кількість становить приблизно від 1,0 до 100 мг/кг/добу, від 5 до 50 мг/кг/добу, від 10 до 30 мг/кг/добу і від 10 до 20 мг/кг/добу. Можна застосовувати менші дози, особливо коли препарат вводять в анатомічно відокремлене місце, наприклад у спинномозкову рідину (CMP), на відміну від перорального введення, у кровотік, у порожнину тіла або в просвітлюваний орган. При місцевому застосуванні можна використовувати значно вищі дози. Фактичні способи приготування композицій для парентерального введення будуть відомі або очевидні фахівцям у цій галузі і описані більш детально в таких вищезгадуваних публікаціях, як Remington. Див. також Nieman, In "Receptor Mediated Antisteroid Action, " Agarwal, et al., eds., De Gruyter, New York (1987).

[0187] Тривалість лікування GRM або SGRM при лікуванні ACC у пацієнтів з надлишком кортизолу може змінюватися залежно від тяжкості стану суб'єкта і відповіді суб'єкта на GRM або SGRM. В деяких варіантах реалізації GRM і SGRM можна вводити протягом періоду від приблизно від 1 тижня до 104 тижнів (2 роки), більш типово приблизно від 6 тижнів до 80 тижнів, найбільш типово приблизно від 9 до 60 тижнів. Відповідні періоди введення також включають від 5 до 9 тижнів, від 5 до 16 тижнів, від 9 до 16 тижнів, від 16 до 24 тижнів, від 16 до 32 тижнів, від 24 до 32 тижнів, від 24 до 48 тижнів, від 32 до 48 тижнів, від 32 до 52 тижнів, від 48 до 52 тижнів, від 48 до 64 тижнів, від 52 до 64 тижнів, від 52 до 72 тижнів, від 64 до 72 тижнів, від 64 до 80 тижнів, від 72 до 80 тижнів, від 72 до 88 тижнів, від 80 до 88 тижнів, від 80 до 96 тижнів, від 88 до 96 тижнів і від 96 до 104 тижнів. До придатних періодів введення також належать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 48, 50, 52, 55, 60, 64, 65, 68, 70, 72, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96, 100 і 104 тижні. Зазвичай застосування GRM або SGRM слід продовжувати, доки не буде спостерігатися клінічно значуще зниження або покращення. Лікування GRM або SGRM згідно з винаходом може тривати до двох років або навіть довше.

[0188] В деяких варіантах застосування введення GRM або SGRM не є безперервним і може бути припинено на один або більше періодів часу, після чого слідують один або більше періодів часу, коли введення відновлюється. Відповідні періоди введення також включають від 5 до 9 тижнів, від 5 до 16 тижнів, від 9 до 16 тижнів, від 16 до 24 тижнів, від 16 до 32 тижнів, від 24 до 32 тижнів, від 24 до 48 тижнів, від 32 до 48 тижнів, від 32 до 52 тижнів, від 48 до 52 тижнів, від 48 до 64 тижнів, від 52 до 64 тижнів, від 52 до 72 тижнів, від 64 до 72 тижнів, від 64 до 80 тижнів, від 72 до 80 тижнів, від 72 до 88 тижнів, від 80 до 88 тижнів, від 80 до 96 тижнів, від 88 до 96 тижнів і

від 96 до 100 тижнів. До придатних періодів, коли введення припиняється, також належать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 48, 50, 52, 55, 60, 64, 65, 68, 70, 72, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96 і 100 тижнів.

[0189] В режимі дозування також враховуються параметри фармакокінетики, добре відомі в цій галузі, тобто швидкість абсорбції, біодоступність, метаболізм, кліренс тощо (див., наприклад, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby (1996) Contraception 54:59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; останню працю Remington's; згадувану вище). Сучасний рівень техніки дозволяє клініцисту визначати режим дозування для кожного окремого пацієнта, модулятора GR і захворювання або стану захворювання.

[0190] Крім того, SGRM можна використовувати в комбінації з іншими активними агентами, які, як відомо, є корисними для модуляції глюкокортикоїдного рецептора, або з допоміжними агентами, які можуть бути неефективними окремо, але можуть сприяти ефективності активного агента. Нові способи, описані в цьому документі, включають введення SGRM у поєднанні з інгібітором контрольної точки антитіла.

[0191] В деяких варіантах застосування спільне введення включає введення одного активного агента, GRM або SGRM, протягом 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 або 24 год. після прийому другого активного агента. Спільне введення включає введення двох активних речовин одночасно, приблизно одночасно (наприклад, приблизно з інтервалом 1, 5, 10, 15, 20 або 30 хв) або послідовно в будь-якому порядку. В деяких варіантах застосування спільне введення може бути здійснено шляхом спільного приготування препарату, тобто приготування єдиної фармацевтичної композиції, яка включає обидва активні агенти. В інших варіантах застосування активні агенти можуть бути складені окремо. В іншому варіанті здійснення активний і/або допоміжний агенти можуть бути зв'язані або кон'юговані один з одним.

[0192] Після того, як фармацевтична композиція, яка включає SGRM, була приготована у прийнятному носії, її можна помістити у відповідний контейнер і призначити для лікування зазначеного стану. Для введення GRM або SGRM таке маркування включатиме, наприклад, інструкції щодо кількості, частоти і способу введення.

[0193] Фармацевтичні композиції цього винаходу можуть бути представлені у вигляді солі і можуть бути утворені з багатьма кислотами, включаючи, але не обмежуючись ними соляну, сірчану, оцтову, молочну, винну, яблучну, янтарну тощо. Солі, як правило, краще розчиняються у воді або інших протонних розчинниках, які є відповідними формами вільної основи. В інших випадках препарат може являти собою ліофілізований порошок з 1-50 мМ гістидину, 0,1 %-2 % сахарози, 2 %-7 % маніту в діапазоні pH від 4,5 до 5,5, який поєднується з буфером перед використанням.

[0194] В іншому варіанті здійснення композиції згідно з даним винаходом придатні для парентерального введення, такого як внутрішньовенне (IV) введення або введення в порожнину тіла або в просвітлюваний орган. Рецептури для введення зазвичай включатимуть розчин композицій цього винаходу розчинених у фармацевтично прийнятному носії. Серед прийнятних носіїв і розчинників, які можна використовувати, є вода і розчин Рінгера, ізотонічний хлорид натрію. Крім того, стерильні нелеткі масла можна традиційно використовувати як розчинник або суспендувальне середовище. Для цієї мети можна використовувати будь-яку м'яку нелетку олію, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, жирні кислоти, такі як-от олеїнова кислота, також можна використовувати для приготування ін'єкційних препаратів. Ці розчини є стерильними і, як правило, не містять небажаних речовин. Ці рецептури можна стерилізувати звичайними, добре відомими методами стерилізації. Рецептури можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як-от регулюючі pH і буферні агенти, регулюючі токсичність агенти, наприклад, ацетат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, лактат натрію тощо. Концентрація композицій за цим винаходом в цих композиціях може варіюватися в широких межах і буде вибиратися насамперед на основі об'ємів рідини, в'язкості, маси тіла тощо, відповідно до обраного конкретного способу введення і потреб пацієнта. Для внутрішньовенного введення рецептура може являти собою стерильний препарат для ін'єкцій, такий як-от стерильна водна або масляна суспензія для ін'єкцій. Цю суспензію можна приготувати відповідно до відомого рівня з використанням відповідних диспергуючих або змочуючих агентів і суспендуючих агентів. Стерильний ін'єкційний препарат також може являти собою стерильний ін'єкційний розчин або суспензію в нетоксичному парентерально прийнятному розчиннику або розчиннику, такому як розчин 1,3-бутандіолу.

ii. Дозування

[0195] Фармацевтичні композиції, придатні для введення, включають композиції, в яких активні інгредієнти, наприклад, інгібітори контрольних точок і SGRM, містяться у кількості, ефективній для досягнення їх передбачуваної мети. Режими дозування коригуються для забезпечення оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної відповіді). Наприклад, можна вводити один болюс, кілька розділених доз можна вводити протягом певного часу або дозу можна пропорційно зменшити або збільшити відповідно до потреб терапевтичної ситуації. Особливо вигідно складати композиції для парентерального введення у формі стандартної дози для простоти введення і однорідності дозування. Форма одиничної дози, яка використовується тут, відноситься до фізично дискретних одиниць, придатних як в одиничній дозі для суб'єктів, які підлягають лікуванню; кожна одиниця містить наперед визначену кількість активної сполуки, розраховану для одержання бажаного терапевтичного ефекту у поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм. Специфікація стандартних лікарських форм згідно з винаходом продиктована і безпосередньо залежить від (a) унікальних характеристик активної сполуки і конкретного терапевтичного ефекту, якого необхідно досягти, і (b) обмежень, властивих техніці приготування таких активних препаратів для лікування, і чутливості у пацієнтів.

[0196] Фактичні рівні дозування активних інгредієнтів в фармацевтичних композиціях цього винаходу можна змінювати так, щоб одержати кількість активного інгредієнта, ефективну для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретного пацієнта, композиції і способу введення, і не бути токсичним для пацієнта. Вибраний рівень дозування буде залежати від ряду факторів, включаючи активність конкретних використовуваних композицій цього винаходу або ефіру, солі або аміду, фармакокінетики композиції, шляху введення, часу введення, швидкості виведення конкретної використовуваної сполуки, тривалості лікування, інші препарати, сполуки і/або матеріали, які використовуються у поєднанні з конкретними використаними композиціями, вік, стать, вага, стан, загальний стан здоров'я і попередня медична історія пацієнта, і подібні фактори, які добре відомі в медицині.

[0197] Фармацевтичні композиції згідно з винаходом переважно є у формі стандартної дози. В такій формі препарат підрозділяється на одиничні дози, які містять відповідну кількість активного компонента, GRM (наприклад, SGRM) або інгібітора контрольної точки антитіла. Стандартна лікарська форма може бути упакованим препаратом, упаковка, яка містить окремі кількості препарату, такі як-от упаковані таблетки, капсули і порошки у флаконах або ампулах. Крім того, стандартна лікарська форма може являти собою капсулу, таблетку, облатку або льодяник, або це може бути відповідна кількість будь-якого з них у упакованій формі.

[0198] Режим дозування інгібіторів контрольних точок або GRM (наприклад, SGRM) також враховує параметри фармакокінетики, добре відомі в цій галузі техніки, тобто швидкість всмоктування, біодоступність, метаболізм, кліренс тощо (див., наприклад, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby (1996) Contraception 54:59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; найновіший Remington, згадуваний вище). Сучасний рівень техніки дозволяє клініцисту визначати режим дозування для кожного окремого пацієнта, SGRM і інгібітора контрольної точки на основі захворювання або стану, який лікується.

[0199] Кількість активного компонента в стандартній дозі препарату можна змінювати або регулювати від 0,1 мг до 10000 мг, більш типово від 1,0 мг до 6000 мг, найбільш типово від 50 мг до 500 мг. Відповідні дози також включають приблизно 1 мг, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 або 2000 мг, залежно від конкретного застосування і потужності активного компонента. Композиція може, за бажанням, також містити інші сумісні терапевтичні засоби. Одноразове або багаторазове введення композицій можна вводити залежно від дозування і частоти, якщо це потрібно і переноситься пацієнтом.

[0200] Композиції, які містять інгібітор контрольної точки антитіла, повинні забезпечувати достатню кількість активного компонента, тобто інгібітора контрольної точки антитіла, при введенні окремо або в комбінації з GRM (наприклад, SGRM), для ефективного лікування раку, наприклад, у кількісті, здатної зменшити навантаження на пухлину ACC або досягти інших корисних або бажаних клінічних результатів, пов'язаних із покращенням раку. Таким чином, режим дозування може варіюватися в широких межах, але може бути визначений стандартними методами. В деяких випадках фармацевтична композиція містить CIC і введення добової дози від приблизно 1 до 2000 мг, переважно від приблизно 10 до приблизно 1000 мг і найбільш переважно від приблизно 250 до 500 мг активного інгредієнта. Добову дозу можна вводити від одного до чотирьох прийомів на добу. Інші схеми дозування включають одну дозу на тиждень і одну дозу на дводенний цикл.

[0201] В деяких випадках фармацевтичні композиції містять CIA і дозування (активного компонента) коливається приблизно від 0,0001 до 100 мг/кг, а частіше від 0,01 до 20 мг/кг залежно від маси тіла пацієнта. Наприклад, дозування може становити 0,3 мг/кг маси тіла, 1 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла, 5 мг/кг маси тіла, 10 мг/кг маси тіла або в діапазоні 0,1-20 мг/кг. Зразковий режим лікування включає введення один раз на добу, один раз на тиждень, два рази на тиждень, один раз на два тижні, один раз на три тижні, один раз на чотири тижні, один раз на місяць, один раз на 3 місяці або один раз на три-шість місяців. В деяких випадках лікування включає введення CIA відповідно до одного з вищезазначених режимів дозування протягом першого періоду і іншого з вищезазначених режимів дозування для другого періоду. В деяких випадках лікування припиняється на деякий час, перш ніж відновлюється той самий або інший режим дозування. Наприклад, пацієнт може бути на схемі дозування CIA протягом двох тижнів, перервати на тиждень, продовжити ще два тижні і так далі. Переважні режими дозування для CIA за винаходом включають 0,1 мг/кг маси тіла, 0,3 мг/кг маси тіла, 2 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг шляхом внутрішньовенного введення, при цьому антитіло вводиться з допомогою однієї з наступних схем дозування: (i) кожні чотири тижні шість доз, потім кожні три місяці; (ii) кожні три тижні; (iii) 3 мг/кг маси тіла одноразово, потім 1 мг/кг маси тіла на наступні три тижні.

[0202] В деяких методах одночасно вводять два або більше CIA з різною специфічністю зв'язування, і в цьому випадку доза кожного введеного антитіла знаходиться в межах зазначених діапазонів. CIA, як правило, застосовуються кілька разів. Інтервали між разовими дозами можуть бути, наприклад, тижневими, місячними, кожні три місяці або щорічними. Інтервали також можуть бути нерегулярними, на що вказує вимірювання рівня антитіл до цільового антигену в крові пацієнта. В деяких методах дозу регулюють для досягнення концентрації антитіл у плазмі приблизно 1-1000 мкг/мл, а в деяких методах приблизно 25-300 мкг/мл.

[0203] Композиції, що містять GRM (наприклад, SGRM), які застосовуються в комбінованій терапії, повинні забезпечувати достатню кількість активного агента для ефективного посилення активності інгібітора контрольної точки при лікуванні раку, наприклад, у кількості, яка у поєднанні з терапевтичною кількістю інгібітора контрольної точки антитіл, може зменшити навантаження на пухлину ACC, відновити сигнальні шляхи Т-клітин і клітин-кілерів (NK), збільшити інфільтрацію Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшити інфільтрацію нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта або іншим чином більшою мірою полегшити пов'язані симптоми раку або досягти більш сприятливих або бажаних клінічних результатів порівняно з введенням інгібітора контрольної точки в тій самій терапевтичній кількості без GRM (наприклад, SGRM). В деяких випадках композиції забезпечують GRM (наприклад, SGRM) у кількості, яка робить пухлину ACC чутливою до інгібітора контрольної точки, тобто демонструє зменшення навантаження на пухлину або іншу пов'язану клінічну користь, яка інакше не проявилася б, при лікуванні пухлини лише інгібітором контрольних точок. Таким чином, режим дозування може варіюватися в широких межах залежно від шляху введення і типу раку, який необхідно лікувати, але може бути визначений стандартними методами. В деяких варіантах реалізації GRM (наприклад, SGRM) вводять один раз на місяць, два рази на місяць, три рази на місяць, через тиждень, один раз на тиждень, двічі на тиждень, три рази на тиждень, чотири рази на тиждень, п'ять разів на тиждень, шість разів на тиждень, через день, щодня, двічі на добу, тричі на добу або частіше.

[0204] В деяких випадках добова пероральна доза для фармацевтичної композиції, яка містить GRM (наприклад, SGRM), може бути використана для способів, описаних тут, коливається від приблизно 1 до приблизно 2000 мг на добу (мг/добу). В деяких варіантах застосування добова кількість становить приблизно від 10 до 1000 мг/добу, від 50 до 500 мг/добу, від 100 до 300 мг/добу. Можна застосовувати менші дози, особливо коли препарат вводять в анатомічно відокремлене місце, наприклад у спинномозкову рідину (CMP), на відміну від перорального введення, у кровотік, у порожнину тіла або в просвітлюваний орган. При місцевому застосуванні можна використовувати значно вищі дози. Фактичні способи приготування композицій для парентерального введення будуть відомі або очевидні фахівцям у цій галузі техніки і описані більш детально в таких публікаціях, як згадувані вище в праці Remington. Див. також Nieman, In "Receptor Mediated Antisteroid Action", Agarwal, et al., eds., De Gruyter, New York (1987). В деяких варіантах реалізації SGRM є CORT125281. В деяких варіантах реалізації SGRM є CORT125134.

[0205] Після того, як фармацевтична композиція, яка містить GRM (наприклад, SGRM) або інгібітор контрольної точки антитіла за винаходом, була приготована у прийнятному носії, її можна помістити у відповідний контейнер і маркована для лікування зазначеного стану. Для

введення GRM (наприклад, SGRM) або інгібітора контрольної точки таке маркування включатиме, наприклад, інструкції щодо кількості, частоти і способу введення.

Комбінована терапія

[0206] Спосіб, описаний у цьому документі, включає комбіновану терапію введення як GRM (наприклад, SGRM), так і інгібітора контрольної точки антитіл пацієнту, який страждає від навантаження на пухлину ACC, що в деяких випадках зумовлено наявністю контрольної точки антитіла чутливої до інгібіторів раку. В деяких варіантах застосування комбінована терапія включає введення інгібітора контрольної точки антитіла і SGRM послідовно у будь-якому порядку протягом всього або частини періоду лікування. Вважається, що комбінована терапія, яка включає введення як GRM (наприклад, SGRM), так і інгібітора контрольної точки антитіл суб'єкту, який страждає від навантаження пухлини ACC, ефективна для зменшення навантаження пухлини ACC, відновлення Т-клітин і природних кілерів (NK), клітинних сигнальних шляхів, збільшують інфільтрацію Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшують інфільтрацію нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта і забезпечують інші терапевтичні переваги для пацієнта.

[0207] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) і інгібітор контрольної точки вводять з тим самим або іншим режимом дозування. В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) вводять відповідно до запланованої схеми, тоді як інгібітор контрольної точки вводять періодично. В деяких випадках інгібітор контрольної точки вводять відповідно до запланованої схеми, тоді як GRM (наприклад, SGRM) вводять періодично. В деяких випадках як GRM (наприклад, SGRM), так і інгібітор контрольної точки вводять періодично. В деяких варіантах реалізації GRM (наприклад, SGRM) вводять щодня, а інгібітор контрольної точки, наприклад, інгібітор контрольної точки антитіла, вводять щотижня або раз на два тижні.

[0208] В деяких випадках GRM (наприклад, SGRM) і інгібітор контрольної точки вводяться послідовно або одночасно один або два рази на місяць, три рази на місяць, через тиждень, один раз на тиждень, двічі на тиждень, три рази на тиждень, чотири разів на тиждень, п'ять разів на тиждень, шість разів на тиждень, через день, щодня, двічі на добу, три рази на добу або частіше, безперервно протягом періоду часу від приблизно одного дня до приблизно одного тижня, від приблизно від двох тижнів до приблизно чотирьох тижнів, від приблизно одного місяця до приблизно двох місяців, від приблизно двох місяців до приблизно чотирьох місяців, від приблизно чотирьох місяців до приблизно шести місяців, від приблизно шести місяців до приблизно восьми місяців, від приблизно восьми місяців до приблизно 1 року, приблизно від 1 року до приблизно 2 років, або приблизно від 2 років до приблизно 4 років, або більше.

[0209] В деяких варіантах застосування комбінована терапія включає спільне введення GRM (наприклад, SGRM) і інгібітора контрольної точки антитіла. В деяких варіантах застосування спільне введення інгібітора контрольної точки антитіла і GRM (наприклад, SGRM) включає введення двох агентів одночасно або приблизно одночасно (наприклад, протягом приблизно 1, 5, 10, 15, 20 або 30 хв один за одним).

[0210] Різні комбінації з GRM або SGRM і інгібітором контрольної точки антитіла можуть бути використані для лікування пацієнта, який страждає на ACC і має надлишок кортизолу. Таке лікування може бути ефективним для зменшення навантаження на пухлину ACC, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта, і надати інші терапевтичні переваги пацієнту. Під "комбінованою терапією" або "у поєднанні з" не мається на увазі, що терапевтичні агенти повинні вводитися одночасно і/або змішуватися для спільної доставки, хоча ці способи доставки входять до сфери, описаної тут. GRM або SGRM і інгібітор контрольної точки антитіла можна вводити, дотримуючись того або іншого режиму дозування. В деяких варіантах застосування GRM або SGRM і інгібітор контрольної точки антитіла вводять послідовно в будь-якому порядку протягом всього періоду лікування або його частини. В деяких варіантах реалізації GRM або SGRM і інгібітор контрольної точки антитіла вводять одночасно або приблизно одночасно (наприклад, приблизно з інтервалом 1, 5, 10, 15, 20 або 30 хв). Необмежувальні приклади комбінованої терапії є такими, вводять GRM або SGRM і інгібітор контрольної точки антитіла, наприклад, GRM або SGRM є "A", а інгібітор контрольної точки антитіла, який вводиться як частина режиму хіміотерапії, є "B":

[0211] A/B/AB/A/BB/B/AA/A/BA/B/BB/A/AA/B/B/B B/A/B/B

[0212] B/B/B/A B/B/A/BA/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0213] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0214] Введення терапевтичних сполук або агентів пацієнту відбуватиметься відповідно до загальних протоколів для введення таких сполук, беручи до уваги токсичність терапії, якщо така є. Хірургічне втручання також може застосовуватися у поєднанні з описаною терапією.

Ці способи можна комбінувати з іншими способами лікування, такими як-от хірургічне втручання, опромінення, цільова терапія, імунотерапія, використання інгібіторів факторів росту або факторів антиангіогенезу.

Тривалість

[0215] Тривалість лікування GRM (наприклад, SGRM) і інгібітором контрольної точки антитіл для зменшення навантаження на пухлину, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), посилення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшити інфільтрацію нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта, а також забезпечити інші терапевтичні переваги для пацієнта може змінюватися відповідно до тяжкості стану пацієнта і відповіді пацієнта на комбіновану терапію. В деяких варіантах реалізації GRM (наприклад, SGRM) і/або інгібітор контрольної точки можна вводити протягом періоду від приблизно 1 тижня до 104 тижнів (2 роки), більш типово приблизно від 6 тижнів до 80 тижнів, найбільш типово приблизно від 9 до 60 тижнів. Відповідні періоди введення також включають від 5 до 9 тижнів, від 5 до 16 тижнів, від 9 до 16 тижнів, від 16 до 24 тижнів, від 16 до 32 тижнів, від 24 до 32 тижнів, від 24 до 48 тижнів, від 32 до 48 тижнів, від 32 до 52 тижнів, від 48 до 52 тижнів, від 48 до 64 тижнів, від 52 до 64 тижнів, від 52 до 72 тижнів, від 64 до 72 тижнів, від 64 до 80 тижнів, від 72 до 80 тижнів, від 72 до 88 тижнів, від 80 до 88 тижнів, від 80 до 96 тижнів, від 88 до 96 тижнів і від 96 до 104 тижнів. До придатних періодів введення також належать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 48, 50, 52, 55, 60, 64, 65, 68, 70, 72, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96, 100 і 104 тижні. Як правило, введення SGRM і/або інгібітора контрольної точки антитіл слід продовжувати, доки не буде спостерігатися бажаний клінічний ефект, і його можна продовжувати після того, як буде спостерігатися такий ефект, наприклад, для підтримки або подальшого посилення такого ефекту. Лікування GRM (наприклад, SGRM) і інгібітором контрольної точки антитіл згідно з винаходом може тривати протягом двох років або навіть довше. В деяких варіантах реалізації тривалість введення GRM (наприклад, SGRM) є такою самою, як і інгібітора контрольної точки. В деяких варіантах реалізації тривалість введення SGRM є коротшою або довшою, ніж для інгібітора контрольної точки.

[0216] В деяких варіантах реалізації введення GRM (наприклад, SGRM) або інгібітора контрольної точки антитіла не є безперервним і може бути припинено на один або більше періодів часу, після чого слідує один або більше періодів часу, коли введення поновлюється. Відповідні періоди введення також включають від 5 до 9 тижнів, від 5 до 16 тижнів, від 9 до 16 тижнів, від 16 до 24 тижнів, від 16 до 32 тижнів, від 24 до 32 тижнів, від 24 до 48 тижнів, від 32 до 48 тижнів, від 32 до 52 тижнів, від 48 до 52 тижнів, від 48 до 64 тижнів, від 52 до 64 тижнів, від 52 до 72 тижнів, від 64 до 72 тижнів, від 64 до 80 тижнів, від 72 до 80 тижнів, від 72 до 88 тижнів, від 80 до 88 тижнів, від 80 до 96 тижнів, від 88 до 96 тижнів і від 96 до 100 тижнів. До придатних періодів, коли введення припиняється, також належать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 30, 32, 35, 40, 45, 48, 50, 52, 55, 60, 64, 65, 68, 70, 72, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 96 і 100 тижнів.

Оцінка покращення в лікуванні пацієнтів з надлишком кортизолу, включаючи зменшення навантаження на пухлину

[0217] Вважається, що описана тут комбінована терапія є ефективною для лікування пацієнтів, які мають надлишок кортизолу і страждають від пухлини ACC; у варіантах застосування таке лікування може бути ефективним для зменшення навантаження на пухлину у пацієнта, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC, зменшення інфільтрації нейтрофілів у пухлини ACC у пацієнта і для забезпечення інших терапевтичних переваг для пацієнта. Методи вимірювання цих відповідей добре відомі кваліфікованим фахівцям у галузі терапії раку. Наприклад, методи вимірювання навантаження на пухлину описані в рекомендаціях щодо критеріїв оцінки відповіді при солідних пухлинах ("RECIST"), доступних на сайті http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/docs/recist_guideline.pdf.

[0218] В одному підході навантаження на пухлину вимірюють шляхом аналізу експресії пухлиноспецифічних генетичних маркерів. Цей підхід особливо корисний для метастатичних пухлин або пухлин, які важко виміряти, наприклад, раку кісткового мозку. Пухлино-специфічний генетичний маркер - це білок або інша молекула, яка є унікальною для ракових клітин або міститься в них набагато більше, ніж у неракових клітинах. Наприклад, див. WO 2006104474. Необмежувальні приклади пухлиноспецифічних генетичних маркерів включають альфа-фетопротеїн (AFP) для раку печінки, бета-2-мікроглобулін (B2M) для множинної мієломи; бета-хоріонічний гонадотропін людини (beta-hCG) для лікування хоріокарциноми і зародкових клітин пухлин; CA19-9 для раку підшлункової залози, раку жовчного міхура, раку жовчних проток і раку шлунку; CA-125 і HE4 для раку яєчників; карциноембріональний антиген (CEA) для

колоректального раку; хромогранін А (CgA) для нейроендокринної пухлини; фібрин/фібриноген при раку сечового міхура; простатоспецифічний антиген (PSA) при раку простати; і тиреоглобулін для раку щитовидної залози. Див, http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet.

[0219] Методи вимірювання рівнів експресії пухлиноспецифічного генетичного маркера добре відомі. В деяких варіантах застосування мРНК генетичного маркера виділяють із зразка крові або тканини пухлини і проводять полімеразно-ланцюгову реакцію зворотної транскриптази в реальному часі (RT-PCR) для кількісної оцінки експресії генетичного маркера. В деяких варіантах застосування, проводять вестерн-блоттинг або імуногістохімічний аналіз для оцінки експресії білка пухлиноспецифічного генетичного маркера. Зазвичай рівні пухлиноспецифічного генетичного маркера вимірюють у багатьох зразках, взятих протягом певного часу комбінованої терапії за винаходом, і зниження рівнів корелює зі зменшенням навантаження на пухлину.

[0220] В іншому підході зменшення навантаження на пухлину за допомогою комбінованої терапії, описаної в цьому документі, проявлялося в зменшенні розміру пухлини або зменшенні кількості раку в організмі. Вимірювання розміру пухлини зазвичай досягається з допомогою методів візуалізації. Наприклад, комп'ютерна томографія (КТ) може надати точну і надійну анатомічну інформацію не лише про зменшення чи ріст пухлини, а й про прогресування захворювання шляхом виявлення росту наявних уражень або розвитку нових уражень або метастазів пухлини. Відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC і зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта також можна виміряти за допомогою методів на основі зображень, або іншим відповідним способом.

[0221] В іншому підході, зменшення навантаження на пухлину, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC і зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта можна оцінити за допомогою методів функціональної і метаболічної візуалізації. Ці методи можуть забезпечити ранню оцінку відповіді на терапію шляхом спостереження за змінами перфузії, оксигенації і метаболізму. Наприклад, 18F-FDG PET використовує радіоактивно мічені молекули-аналоги глюкози для оцінки тканинного метаболізму. Пухлини зазвичай мають підвищене поглинання глюкози, зміна значення, що відповідає зниженню метаболізму пухлинної тканини, вказує на зменшення навантаження на пухлину. Подібні методи візуалізації описані в Kang et al., Korean J. Radiol. (2012) 13(4) 371-390.

[0222] Пацієнт, який одержує описану тут комбіновану терапію, може демонструвати різний ступінь зменшення навантаження на пухлину і може демонструвати різний ступінь відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в ACC пухлини і зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта. В деяких випадках у пацієнта може спостерігатися повна відповідь (CR), яка також називається "без ознак захворювання (NED)". CR означає, що вся пухлина, яку можна виявити, зникла, як вказують аналізи, фізичні обстеження і сканування. В деяких випадках пацієнт, який одержує описану тут комбіновану терапію, може відчувати часткову відповідь (PR), яка приблизно відповідає, щонайменше 50 % зменшенню загального об'єму пухлини, але за наявності деякого залишкового захворювання. В деяких випадках залишкове захворювання при глибокій частковій відповіді насправді може бути мертвою пухлиною або рубцем, тому кілька пацієнтів, класифікованих як такі, що мають PR, можуть насправді мати CR. Крім того, у багатьох пацієнтів, у яких спостерігається зменшення під час лікування, спостерігається подальше зменшення при продовженні лікування і може бути досягнуто CR. В деяких випадках у пацієнта, який одержує комбіновану терапію, може спостерігатися незначна реакція (MP), що грубо означає невелике зменшення, яке перевищує 25 % від загального об'єму пухлини, але менше ніж 50 %, щоб досягти PR. В деяких випадках пацієнт, який одержує комбіновану терапію, може демонструвати стабільне захворювання (SD), що означає, що пухлини залишаються приблизно однакового розміру, але може мати місце невелике збільшення (зазвичай менше 20 або 25 %) або невелику кількість зменшення (дещо менше, ніж PR, якщо тільки не виникне незначна відповідь. Якщо так, тоді SD визначається як зазвичай менше 25 %).

[0223] На додаток до зменшення навантаження на пухлину ACC, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення інфільтрації Т-клітин і NK-клітин в пухлину ACC і зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC, бажана користь або бажані клінічні результати від комбінованої терапії можуть також включати, наприклад, зменшення (тобто певною мірою уповільнення і/або припинення) інфільтрації ракових клітин в периферичні органи; інгібувати (тобто певною мірою сповільнювати і/або зупиняти) метастазування пухлини; підвищення рівня відповіді (RR); збільшена тривалість відповіді; деякою мірою полегшує один

або більше симптомів, пов'язаних із раком; зниження дози інших ліків, необхідних для лікування захворювання; уповільнене прогресування захворювання; і/або продовження виживання пацієнтів і/або покращення якості життя. Методи оцінки цих ефектів добре відомі і/або розкриті, наприклад, у http://cancerguide.org/endpoints.html і рекомендаціях RECIST, згаданих вище.

ПРИКЛАДИ

[0224] Наступні приклади наведені лише для ілюстрації, а не для обмеження. Кваліфіковані спеціалісти легко розпізнають множину некритичних параметрів, які можна змінити або модифікувати, щоб одержати по суті подібні результати.

Приклад 1. HepG2 аналіз тирозинамінотрансферази (TAT)

[0225] Наступний протокол описує аналіз для вимірювання індукції TAT дексаметазоном у клітинах HepG2 (лінія клітин гепатоцелюлярної карциноми печінки людини; ECACC, Великобританія). Клітини HepG2 культивують з використанням середовища MEME, доповненого 10 % (об./об.) ембріональної бичачої сироватки; 2 мМ L-глутаміну і 1 % (об./об.) NEAA при 37ºC, 5 %/95 % (об./об.) CO2/повітря. Потім клітини HepG2 підраховують і доводять до щільності 0,125×106 клітин/мл у RPMI 1640 без червоного фенолу, 10 % (об./об.) очищеного вугіллям FBS, 2 мМ L-глутаміну і висівають у кількості 25000 клітин/лунку в 200 мкл у 96-лункові стерильні планшети для мікротитрування тканинної культури і інкубують при 37 °C, 5 % CO2 протягом 24 год.

[0226] Потім середовище для росту видаляють і замінюють середовищем для аналізу {RPMI 1640 без червоного фенолу, 2 мМ L-глутаміну + 10 мкМ форсколіну}. Потім тестові сполуки перевіряють на дію 100 нМ дексаметазону. Потім сполуки послідовно наполовину розводять у 100 % (об'єм/об'єм) диметилсупфоксиду з 10 мМ основного розчину. Потім генерується 8-точкова напівлогарифмічна крива розведення з таким розведенням 1:100 у досліджуваному середовищі, щоб одержати 10-кратний остаточний аналіз концентрації сполуки, що призводить до остаточного аналізу концентрації сполуки, який коливався від 10 до 0,003 мкМ в 0,1 % (об./об.) диметилсульфоксиду.

[0227] Досліджувані сполуки попередньо інкубують із клітинами в мікротитральних планшетах протягом 30 хв при 37 °C, 5/95 (об./об.) CO2/повітря, перед додаванням 100 нМ дексаметазону, а потім протягом 20 год., щоб забезпечити оптимальну індукцію TAT.

[0228] Потім клітини HepG2 лізують з 30 мкл буфера для лізису клітин, який містить суміш інгібіторів протеази, протягом 15 хв при 4 °C. Потім можна додати 155 мкл суміші субстрату, яка містить 5,4 мМ натрієвої солі тирозину, 10,8 мМ альфа-кетоглутарату і 0,06 мМ піридоксаль-5'-фосфату в 0,1 М калій-фосфатному буфері (pH 7,4). Після 2 год. інкубації при 37ºC реакцію можна припинити, додавши 15 мкл водного 10 М розчину гідроксиду калію, і планшети інкубують ще 30 хв при 37 °C. Продукт активності TAT можна виміряти за поглинанням на λ 340 нм.

[0229] Значення IC50 можна розрахувати шляхом побудови графіка % інгібування (нормованого на 100 нМ стимуляції дексаметазоном TAT) проти концентрації сполуки і підгонки даних до логістичного рівняння за 4 параметрами. Значення IC50 можна перетворити на Ki (константа рівноважної дисоціації) за допомогою рівняння Ченга і Прусоффа, припускаючи, що антагоністи є конкурентними інгібіторами по відношенню до дексаметазону.

Приклад 2. Експресія генів у пацієнтів з пухлиною ACC з надлишком кортизолу

[0230] Методи: Статус GC, експресія мРНК, мутація ДНК і дані метилювання ДНК від різних резекцій надниркових залоз (n=71) були доступні через Атлас генному раку (TCGA) (доступний за URL-адресою "cancer.gov" за адресою about-nci/organization/ccg /research/srtuctural-genomics/tcga). Для деконволюції чисельності типів імунних клітин було застосовано xCell до даних мРНК. Метод випадкового лісу використовувався для одержання сигнатур генів (Aran, Dvir, Zicheng Hu, and Atul J. Butte. "xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape." Genome biology 18.1 (2017):220). Аналіз генів також можна виконати через cBioPortal (доступний через cbioportal.org).

[0231] Результати: Експресія 858 генів значно відрізнялася між випадками GC- і GC+ACC. Аналіз шляху KEGG показав вищу експресію генів 7 шляхів, залучених до синтезу і секреції стероїдів у випадках GC+. Дев'ятнадцять шляхів показали нижчу експресію, більшість з яких були пов'язані з природними клітинами-кілерами, Т-клітинами і імунною активністю. Гіпометилювання в першу чергу спостерігалося в шляхах синтезу стероїдів. Пам'ять CD4+, яка інфільтрує пухлину (P=0,003), CD8+ пам'ять (P<0,001) і NKT-клітини (P=0,014) були виснажені у випадках GC+, тоді як асоційовані з пухлиною нейтрофіли були збагачені (P<0,001). Більша захворюваність на пухлинні мутації (TMB) спостерігалася у випадках GC+ (P=0,029).

[0232] Пухлини GC+ACC показали специфічні відмінності в імунних процесах порівняно з пухлинами ACC без системного надлишку кортизолу. Зокрема, гени, залучені до цитотоксичності, опосередкованої природними кілерами (NK), диференціації клітин TH17,

передачі сигналів рецепторів Т-клітин, диференціації TH1/2, а також процесингу і презентації антигену були знижені в пухлинах GC+ACC (Фіг. 1).

[0233] Крім того, наявність специфічних імунних клітин була різною в пухлинах ACC з надлишком або без надлишку кортизолу. Наївні і пам'ятні клітини CD4+, CD8+ клітини, CD8+ клітини центральної пам'яті і природні Т-клітини-кілери (NKT) були нижчими у випадках GC+ (Фіг. 2). Навпаки, асоційовані з пухлиною нейтрофіли (TAN) були вищими в GC+ACC.

[0234] Велика кількість імунних клітин і імунозалежних транскриптів нижча в GC+ACC. Вищий TMB в пухлинах GC+ може бути пов'язана із підвищеною толерантністю до неоантигенів. Ці результати свідчать про те, що антагонізм GR може сприяти імунній відповіді пухлини в ACC або інших злоякісних новоутвореннях з підвищеною активністю GC шляхом усунення імуносупресивних ефектів ендогенного GC.

Висновки:

[0235] Клінічна відповідь на інгібітори контрольних точок антитіл залежить від імунної системи. Зокрема, функція Т-клітин і презентація антигену є критичними для клінічної ефективності інгібіторів контрольних точок антитіл. Крім того, інфільтрація імунних клітин пов'язана з клінічною ефективністю інгібіторів контрольних точок антитіл. Пухлини з низьким вмістом Т-клітин або високим вмістом нейтрофілів, як правило, погано реагують на інгібітори контрольних точок антитіл. Таким чином, усунення ефектів GC+ з допомогою GRM (наприклад, SGRM) може покращити відповідь на інгібітор контрольної точки антитіла. Таким чином, вважається, що введення GRM, такого як SGRM, у поєднанні з інгібітором контрольних точок антитіла є ефективним для зменшення навантаження на пухлину, відновлення сигнальних шляхів Т-клітин і природних клітин-кілерів (NK), збільшення Т-клітин і NK-клітинна інфільтрація в пухлину ACC, зменшення інфільтрації нейтрофілів в пухлину ACC у пацієнта, який страждає на ACC і має надлишок кортизолу.

Приклад 3. Експресія генів у пацієнтів з пухлиною ACC з надлишком кортизолу

[0236] Методи: Доступ до статусу GC (на основі клінічних ознак і симптомів або біохімічних доказів), експресії мРНК, мутації ДНК і даних метилювання ДНК від різних резекцій надниркових залоз (n=71) було одержано через TCGA (www.cancer.gov/tcga). Два випадки саркоматоїду були виключені з аналізу. Було проаналізовано 394 036 зондів метилювання, а дані нормалізовані за допомоги квантильної нормалізації бета-суміші (BMIQ). Для деконволюції чисельності типів імунних клітин, було застосовано xCell до даних мРНК (Aran et al., Genome Biol. 18(1):220 (2017)). Випадки пухлин оцінювали за допомогою опублікованої сигнатури активності GR (West et al., 24(14):3433-3446 (2018)). Методи випадкового лісу були використані для одержання сигнатури гена, які передбачають пухлини GC+. Сигнатурні гени були ідентифіковані шляхом завантаження випадкових лісів на випадкових підмножинах, які містять 80 % даних, і порівняння середньої завантаженої важливості генів із пороговим значенням. Порогове значення було обчислене шляхом застосування тієї самої процедури до випадкового лісу з прогнозуванням рандомізованих міток замість справжніх міток GC+/- для імітації відсутності сигналу. В якості порогу було обрано 99,9-й квантиль важливості гена.

[0237] Результати: Адренокортикальні карциноми класифікували за глюкокортикоїдним статусом пухлини (Фіг. 3A). Використовуючи дані мРНК в TCGA, були ідентифіковані гени, які значно відрізнялися за загальним гормональним або GC статусом (>2-кратна зміна і скоригований P≤0,05). Було визначено, що наявність або відсутність надлишку GC (GC+/-) впливає на найбільшу кількість генів (858 генів, порівняння 1 на Фіг. 3A, і як показано на Фіг. 3B. Визначення наявності і відсутності будь-якого гормону (H+/-) призвело до значної різниці в 439 генах (Порівняння 2). (H+ вказує на наявність гормону, а H- вказує на відсутність гормону (наприклад, не виявлено GC, андрогенів, естрогенів, прогестерону тощо.)) Не було істотної різниці між H-пухлинами і тими, що експресують лише гормони, non-GC (NGC+, Порівняння 3). Порівняння NGC+vs GC+ виявило 185 значно різних генів (Порівняння 4). Аналіз шляху Кіотської енциклопедії генів і геномів (KEGG) виявив вищу експресію генів у випадках GC+ у кількох шляхах синтезу стероїдів і нижчу експресію в ряді шляхів, пов'язаних з імунною системою (Фіг. 1).

[0238] Як зазначено в Прикладі 2 вище, Фіг. 2 показує велику кількість специфічних типів імунних клітин в пухлинах ACC. Кількість лімфоцитів була нижчою (ліворуч), тоді як кількість мезенхімальних стовбурових клітин і нейтрофілів була вищою (праворуч) у випадках GC+. Пухлини GC+ACC демонструють меншу кількість лімфоцитів, більшу кількість мієлоїдних і мезенхімальних стовбурових клітин і більшу захворюваність з мутацією пухлини. Аналіз xCell показав, що Т-клітини (P<0,005) і природні Т-клітини-кілери (NKT-клітини P=0,014) були менш поширені у випадках GC+ порівняно з GC- (Фіг. 2, ліворуч). Навпаки, мезенхімальні стовбурові

клітини і нейтрофіли були більш поширеними у випадках GC+ (P<0,001, Фіг. 2, праворуч). Вища захворюваність з мутацією пухлини також спостерігалася у випадках GC+ (P=0,029, Фіг. 7).

[0239] Як показано на Фіг. 3B, виявлено, що надлишок GC значно впливає на експресію 858 генів. Гени з вищою експресією у випадках GC+ (P≤0,05 і >2-кратна зміна експресії порівняно з GC-) показані у верхньому правому куті. Гени з меншою експресією у випадках GC+ показані у верхньому лівому куті.

[0240] Надлишок GC пов'язаний з гіпометилюванням генів синтезу стероїдів (Фіг. 4). У випадках GC+ACC велика кількість генів була значно гіпометильована (Фіг. 4, верхня ліворуч), тоді як менша кількість генів була гіперметильована (Фіг. 4, верхня справа). Більша кількість генів була значно гіпометильована (P≤0,05, Δ бета <-0,2), ніж гіперметильована (P≤0,05, Δ бета >0,2) в пухлинах GC+ (Фіг. 4). Значення бета представляють відсоток метилювання в гені. Відмінності в метилюванні можуть пояснити підвищення регуляції шляхів стероїдогенезу, але не зниження регуляції імунних шляхів. Гіпометильовані гени були в основному пов'язані з альдостероном, GC і синтезом/секрецією жовчі - шляхами, які посилюються в GC+ ACC (Фіг. 1). Навпаки, імунні шляхи зі зниженою регуляцією експресії генів, ідентифіковані з допомогою аналізу мРНК, не були збагачені ані гіпо-, ані гіперметильованими наборами.

[0241] Як показано на Фіг. 5 і 6, пригнічення імунних генів пов'язане з продукуванням GC. Неконтрольована кластеризація нормалізованої експресії генів для шляхів сигналізації Т-клітинного рецептора і опосередкованої природними клітинами-кілерами цитотоксичність шляхів KEGG показало нижчу експресію генів у випадках GC+ (Фіг. 5). І навпаки, при кластеризації GC+ і GC- окремо, випадки GC+ мають тенденцію до зниження експресії в цих двох імунозалежних шляхах (Фіг. 6).

[0242] Фіг. 5 ілюструє неконтрольовану кластеризацію нормалізованої експресії генів для 2 шляхів KEGG. Показані шляхи включають сигналізацію Т-клітинних рецепторів і цитотоксичність, опосередковану природними клітинами-кілерами. Два верхніх рядки вказують на GC і загальний гормональний статус для кожної пухлини (чорний: GC+/H+, білий: GC-/H-), відтінки синього/червоного (показані в градаціях сірого) показують нормалізовану експресію генів для кожної пухлини, причому більш темно-синій відповідає меншій експресії. При кластеризації за експресією генів випадки GC+ з'являються праворуч від малюнка, де багато генів демонструють нижчу експресію.

[0243] Фіг. 6. Контрольована кластеризація нормалізованої експресії генів для 2 шляхів KEGG, показаних на Фіг. 5. У випадках GC+ (кластер праворуч) в цих шляхах домінує нижча експресія генів (темно-синій).

[0244] Фіг. 7. Підвищення навантаження мутації пухлини в GC+ACC. У випадках GC+ спостерігалося більше міссенс- і нонсенс-мутацій порівняно з випадками GC-. (Випадок – це пухлина окремого пацієнта. "Мутацій на випадок" - це загальна кількість мутацій, виявлених в одній пухлині.)

[0245] Фіг. 8. Оцінка активності GR для різних типів пухлин і підмножин ACC. ACC продемонстрував високу GR-керовану генну активність порівняно з іншими пухлинами і незалежно від гормонального статусу (див. вставку). Активність GR висока в ACC, незалежно від гормонального статусу. Оцінка пухлини з використанням опублікованої GR-керованої сигнатури гена, визначеної з 74 GR генів, пов'язаних з активацією (West et al., 24(14):3433-3446 (2018)) підтвердила, що активність GR є високою при ACC порівняно з іншими типами пухлин за Атласом генному раку (TCGA; Фіг. 8). Не було різниці між випадками ACC з різним гормональним і GC статусом (вставка на Фіг. 8).

[0246] Фіг. 9. Генна сигнатура може передбачити випадки пухлин, подібних до GC+. На Фіг. 9 ілюструються результати виведення генної сигнатури, яка розрізняє випадки GC+/- ACC на основі аналізу методом випадкового лісу. NLRP1 і ZNF683 (виділені) були ідентифіковані як важливі компоненти сигнатури. Показані лише сигнатури генів, які перевищують порогове значення 0,0028. Методи випадкового лісу використовувалися для одержання моделі, яка розрізняє випадки GC+/- ACC з ROC AUC=0,87±0,09 (Фіг. 9). Сенсорний компонент інфламмасоми (NLRP1) і медіатор активації NK IL-15 (ZNF683) були визначені як важливі частини цієї сигнатури (вставка на Фіг. 9).

[0247] Як показано на Фіг. 10A і 10B, сигнатуру гена потім застосували до інших типів пухлин в TCGA, щоб ідентифікувати тих, які мають GC+ подібні профілі транскрипції. На Фіг. 10A показане застосування сигнатури гена ACC до пухлин TCGA. На основі відомого розподілу випадків GC+/- в ACC було одержано граничну оцінку 0,75 для розрізнення пухлин GC+/- (горизонтальна лінія на Фіг. 10A). Відповідно до цього показника, Увеальна (UVM) і шкірна меланоми (SKCM) можуть мати найвищу частоту випадків, подібних до GC+ACC (Фіг. 10B). Фіг. 10B показує прогнозовану частоту випадків пухлин, подібних до GC+ACC. Передбачається, що

Увеальна (UVM) і шкірна меланоми шкіри (SKCM) мають найвищу частоту пухлин, які нагадують GC+ACC.

[0248] Надлишок глюкокортикоїдів (GC+) впливає на значно більше генів ACC, ніж інші гормони. В GC+ACC експресія синтезу генів стероїдів була підвищена, тоді як імунозалежні гени були пригнічені. Нормальні клітини надниркових залоз експресують гени синтезу стероїдів, але не гени, пов'язані з імунною системою. Гени синтезу стероїдів були гіпометильовані у випадках GC+, тоді як не було виявлено різниці в метилюванні між випадками GC+ і GC- для імунних генів. Крім того, менше інфільтруючих імунних клітин (Т-клітин і NKT-клітин) було виявлено у випадках GC+ порівняно з GC-, що свідчить про те, що імунні ефекти зумовлені змінами інфільтрату імунних клітин, а не змінами транскрипції. Захворюваність з мутацією пухлини була вищою у випадках GC+ACC, що може бути спричинено спостережуваним пригніченням імунітету або виключенням імунних клітин, що може бути пов'язано з вищою толерантністю до невласних антигенів у випадках GC+. Опублікована оцінка активності GR не показала різниці між випадками GC+ і GC-, що може бути пов'язано з локальними високими концентраціями GC в надниркові залозі незалежно від системних рівнів GC. Навпаки, на імунну інфільтрацію в пухлини ACC може негативно вплинути дія на лімфатичні вузли підвищеної активності GC. Нещодавно одержана сигнатура гену передбачає найвищу частоту GC+ подібних пухлин у Увеальних і шкірних меланомах. Спостережуване зменшення кількості імунних клітин і імунозалежних транскриптів в GC+ACC дає уявлення про механізми, з допомогою яких GC може обмежувати відповідь на терапію інгібітором контрольних точок імунної системи (ICI). Антагонізм GR може збільшити імунозалежні транскрипти або інфільтрацію імунних клітин, таким чином сприяючи імунні відповіді пухлини при GC+ACC і інших злоякісних пухлинах з підвищеною активністю GC.

Приклад 4. Вплив кортизолу і релакориланту на функцію природних клітин-кілерів in vitro

[0249] Враховуючи виразні відмінності в природних клітинах-кілерах (NK) між GC+ і GC-ACC, вплив кортизолу оцінювали на людських NK-клітинах in vitro. Кортизол пригнічував (і відновлював) активацію NK-клітин, проліферацію і пряме знищення пухлинних клітин. Зменшена кількість NK-клітин і інших імунних клітин у GC+ACC дає уявлення про механізми, з допомогою яких GC може обмежувати відповідь на терапію ICI. Антагонізм GR може збільшити чисельність і функцію NK-клітин і інших імунних клітин в пухлині, таким чином сприяючи імунній відповіді пухлини при GC+ACC і інших злоякісних пухлинах з підвищеною активністю GC. Ця гіпотеза буде перевірена у Фазі 1 випробування релакориланту + ICI.

Дія кортизолу і релакориланту на функцію NK-клітин in vitro

[0250] Враховуючи значне пригнічення пов'язаних з NK генів у випадках GC+, були оцінені прямі ефекти модуляції GR людських NK-клітин. NK-клітини виділяли від здорових донорів і стимулювали з IL-2. Активація (надлишок CD25+CD69+ клітин) була збільшена шляхом стимуляції, пригнічена кортизолом і відновлена релакорилантом (Манна-Уітні p=0,0039) (Фігу 11A). Проліферація NK-клітин також посилювалася стимуляцією, пригнічувалася кортизолом і відновлювалася релакорилантом (Манна-Уітні p=0,0099) (Фіг. 11B). Секреція цитокінів (як транскрипту, так і секретованого білка) також збільшувалася шляхом стимуляції, пригнічувалася кортизолом і відновлювалася релакорилантом (Фіг. 12A-12D). Гени, які значно індукувалися стимуляцією, пригнічувалися кортизолом і відновлювалися релакорилантом, включали ключові гени активації NK, включаючи рецептор IL2 і активатор LAG3. (Фіг. 12D). Ці дані надають експериментальне підтвердження спостережуваних ефектів GC на популяції NK-клітин в пухлинах ACC.

[0251] Активація, проліферація і секреція цитокінів свідчать про функціональні зміни в NK-клітинах, опосередковані кортизолом і релакорилантом. Щоб визначити, чи ця функціональна зміна також вплинула на знищення клітин-мішеней, NK-клітини інкубували з клітинами пухлини K562. При різних співвідношеннях NK: клітини пухлини кортизол пригнічував знищення пухлинних клітин, а релакорилант відновлював їх (Фіг. 13A). Спостерігалося значне покращення у знищенні NK-клітин пухлини, коли релакорилант додавали до NK-клітин у співвідношенні 5:1 (Манна-Уїтні p=0,004) (Фіг. 13B). Таким чином, глюкокортикоїди пригнічують знищення пухлинних клітин NK-клітинами людини in vitro.

[0252] Кортизол є потужним регулятором транскрипції і медіатором функції імунних клітин. Оцінка впливу системної активності кортизолу є складною, оскільки добові і годинні варіації кортизолу обмежують інтерпретацію будь-якої окремої оцінки кортизолу. Дані мультиоміки ACC забезпечують унікальний сценарій, у якому багаті дані мультиоміки поєднуються з клінічною оцінкою надлишку кортизолу. Ця перебільшена фізіологія кортизолу була досліджена як для кращого розуміння ACC, так і для одержання інформації про можливі субклінічні прояви активності кортизолу в інших типах пухлин.

[0253] Значні відмінності у 858 генах спостерігалися між випадками ACC з надлишком або без надлишку GC. Менша кількість генів значно відрізнялася в інших порівняннях, таких як випадки + vs – для будь-якого стероїдного гормону. Гени, які беруть участь у синтезі стероїдів, були, як не дивно, високими у випадках з надлишком GC. Гіпометилювання промотора спостерігалося для генів синтезу стероїдів. Навпаки, знижена експресія імунних генів у випадках GC+, імовірно, була наслідком слабкої інфільтрації імунних клітин в пухлини GC+. Оцінка активності GR (через опубліковану сигнатуру гену; див. West et al., Clin Cancer Res, 2018. 24(14): p. 3433-3446) припустив, що внутрішньопухлинна активність GR є подібною у випадках ACC з надлишком або без надлишку GC. Це може бути викликано високим рівнем кортизолу з надниркової залозою, незалежною від системного рівня кортизолу. Таким чином, відмінності в імунній інфільтрації можуть бути наслідком системних ефектів GC, включаючи вплив на первинні і вторинні лімфоїдні органи по всьому тілу. Вплив GC на лімфоїдні органи також може бути пов'язаний із збільшенням TMB, що спостерігається у випадках GC+ACC, оскільки високий GC може підвищити толерантність до неоантигенів.

[0254] Використовуючи випадки GC+vs GC-, було виявлено сигнатуру гену, за якою можна відрізнити ці два типи. Ця сигнатура гену може бути корисною в майбутніх спробах діагностувати надлишок GC при біопсії або резекції пухлини. Коли пухлини, не пов'язані з ACC, оцінювали за цією ознакою, Увеальні і шкірні меланоми демонстрували найчастіші (хоча все ще рідкісні) випадки, які нагадували транскрипційну сигнатуру GC+ACC. Це підтверджує попередні повідомлення про місцеве вироблення кортизолу в шкірі (див. Vekulic et al., and Tissue Injury. J Biological Chemistry, 2011. 286(12) pp. 10265–10275). Такі пухлини забезпечать обґрунтований вибір для оцінки імунних ефектів антагонізму GR поза ACC.

[0255] Пригнічення NK-клітин було помітним у даних з мультиоміки GC+ACC. Гени активації NK були значно нижчими у випадках GC+, а ген активації NK ZNF683 був одним із найважливіших генів у розрізненні випадків GC+ від GC-. Функціональні дослідження з NK-клітинами людини, кортизолом і GR модулятора релакорилант підтвердили, що GR є ключовим регулятором функції NK. Кортизол пригнічує проліферацію NK, активацію маркерів активації клітинної поверхні, знищення пухлинних клітин, секрецію IFNγ і транскрипцію IFNγ. Він також пригнічував секрецію інших ефекторних цитокінів і експресію рецептора IL-2 (il2ra). Ці спостереження підтверджують зменшення генів активації NK, яка спостерігається при GC+ACC. Кортизол пригнічував і релакорилант сприяв експресії LAG3 (CD223, lag3) і 4-1BB (CD137 tnfrsf9), обох мішеней експериментальних агоністів, призначених для покращення протипухлинної імунної відповіді. Експресія ліганду хемокіну 3-подібного 1 (ccl3l1), хемокіну, який притягує лімфоцити, також пригнічувалася кортизолом в стимульованих NK-клітинах, що також могло б пояснити зменшення Т-клітинного інфільтрату в GC+ACC. Спостережуване зменшення кількості імунозалежних транскриптів в GC+ACC дає уявлення про механізми, з допомогою яких GC може обмежувати відповідь на терапію ICI.

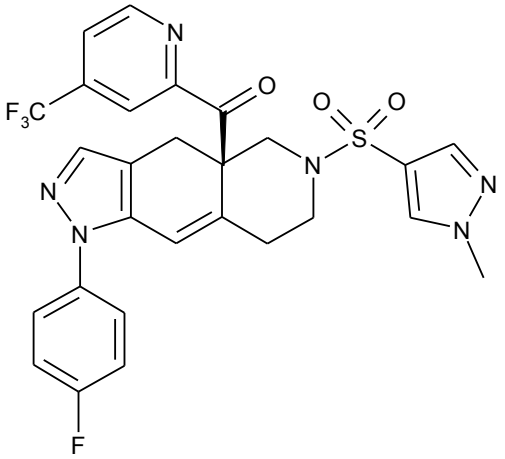
[0256] Рак надниркових залоз - це важке захворювання, при якому пацієнти стикаються з проблемами як у лікуванні пухлини, так і гормонального фону. Пацієнти з ACC з надлишком кортизолу відчувають синдром Кушинга, стан, який описує системний надлишок кортизолу з надниркових залоз, гіпофізу або ектопічного походження. Синдром Кушинга сам по собі може призвести до смерті через судинні події, серцево-судинні події або інфекції у цих пацієнтів (див. Yaneva M., et al., European J Endocrinology 2013, 169 621-627). Модулятор GR KorylmTM (міфепристон) схвалений для лікування симптомів надлишку кортизолу. Ці дані йдуть далі і свідчать про те, що селективна модуляція GR з допомогою релакориланту може полегшити пригнічення імунітету, викликане системним кортизолом. Таким чином, селективний антагонізм GR може сприяти протипухлинній ефективності інших імуномодуляторів, таких як-от інгібітори імунних контрольних точок або більш експериментальних агентів, націлених на NK, і зменшувати небезпечні наслідки надлишку кортизолу. Ця гіпотеза перевіряється безпосередньо в цьому дослідженні Фази I або релакорилант + пембролізумаб у пацієнтів з ACC з надлишком GC.

[0257] Вплив надлишку GC на NK-клітини був особливо вираженим, і пряма оцінка впливу кортизолу на NK-клітини in vitro підтвердила потужну і широку супресивну активність. Крім того, релакорилант може скасувати дію кортизолу і відновити активацію NK-клітин, проліферацію і знищення клітин-мішеней. Відповідно, вважається, що лікування пацієнтів з адренокортикальною карциномою, які страждають від надлишку кортизолу (GC+ACC), шляхом комбінованого введення модулятора GR, такого як релакорилант, і інгібітора імунної контрольної точки (ICI), забезпечує ефективне і покращене лікування порівняно з лікуванням лише з ICI.

[0258] Всі патенти, патентні публікації, публікації і патентні заявки, цитовані в цій специфікації, включені в цей документ шляхом посилання у всій їх повноті, якщо кожна окрема публікація або патентна заявка була спеціально і окремо зазначена для включення шляхом посилання. Крім того, незважаючи на те, що вищезазначений винахід був описаний досить докладно з допомогою ілюстрації і прикладу для ясності розуміння, для фахівців в цій галузі буде зовсім очевидно, в світлі принципів цього винаходу, що певні зміни і модифікації до нього можуть бути внесені без відходу від духу або обсягу доданої формули винаходу.

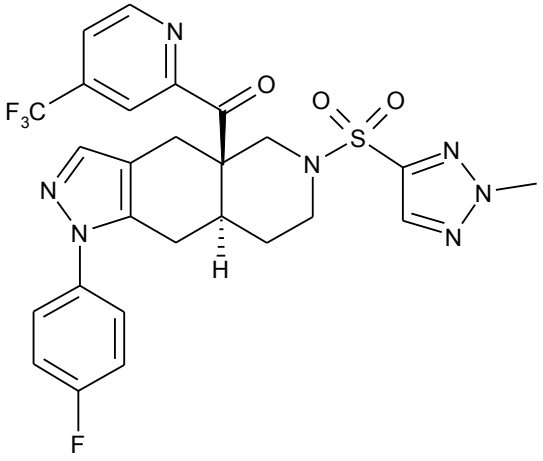
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Комбінація 1) селективного модулятора глюкокортикоїдного рецептора (SGRM), що є релакорилантом та має формулу:



,

або SGRM CORT125281, що має формулу:



, і

2) інгібітора контрольної точки антитіла, вибраного з антитіла, ефективного проти PD-1, антитіла, ефективного проти CTLA-4, антитіла, ефективного проти PD-L1, та антитіла, ефективного проти PD-L2,

для лікування пухлини адренокортикальної карциноми у пацієнта, який страждає на ACC та має надлишок кортизолу.

2. Комбінація за п. 1, яка додатково включає хіміотерапевтичний агент, вибраний з групи, яка складається з таксанів, алкілуючих агентів, інгібіторів топоізомерази, агентів, які викликають стрес ендоплазматичного ретикулуму, антиметаболітів, інгібіторів мітозу та їх комбінацій.

3. Комбінація за п. 2, в якій хіміотерапевтичним засобом є таксан.

4. Комбінація за п. 2, де хіміотерапевтичний засіб вибрано з групи, яка складається з наб-паклітакселу, 5-фторурацилу (5-FU), гемцитабіну, цисплатину та капецитабіну.

5. Фармацевтична композиція, яка містить:

(i) сполуку, вибрану з релакориланту, CORT125281, та

(ii) інгібітор контрольної точки антитіла, ефективного проти PD-1, CTLA-4, PD-L1 або PD-L2,

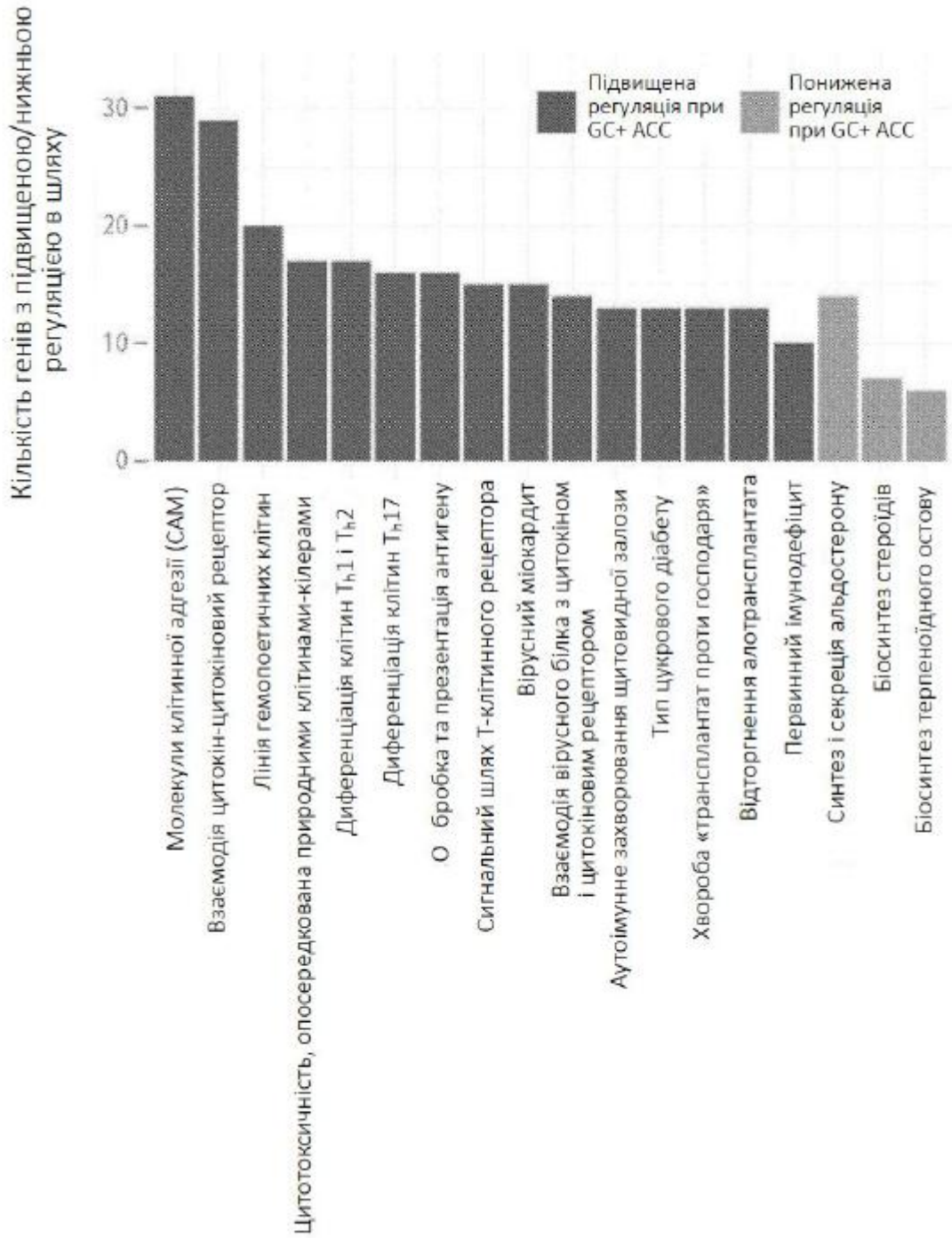
для застосування при лікуванні адренокортикальної карциноми (ACC) у пацієнта з надлишком кортизолу, який страждає на ACC.

6. Фармацевтична композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що сполука є релакорилантом, а інгібітор контрольної точки антитіла є антитілом, ефективним проти PD-1.

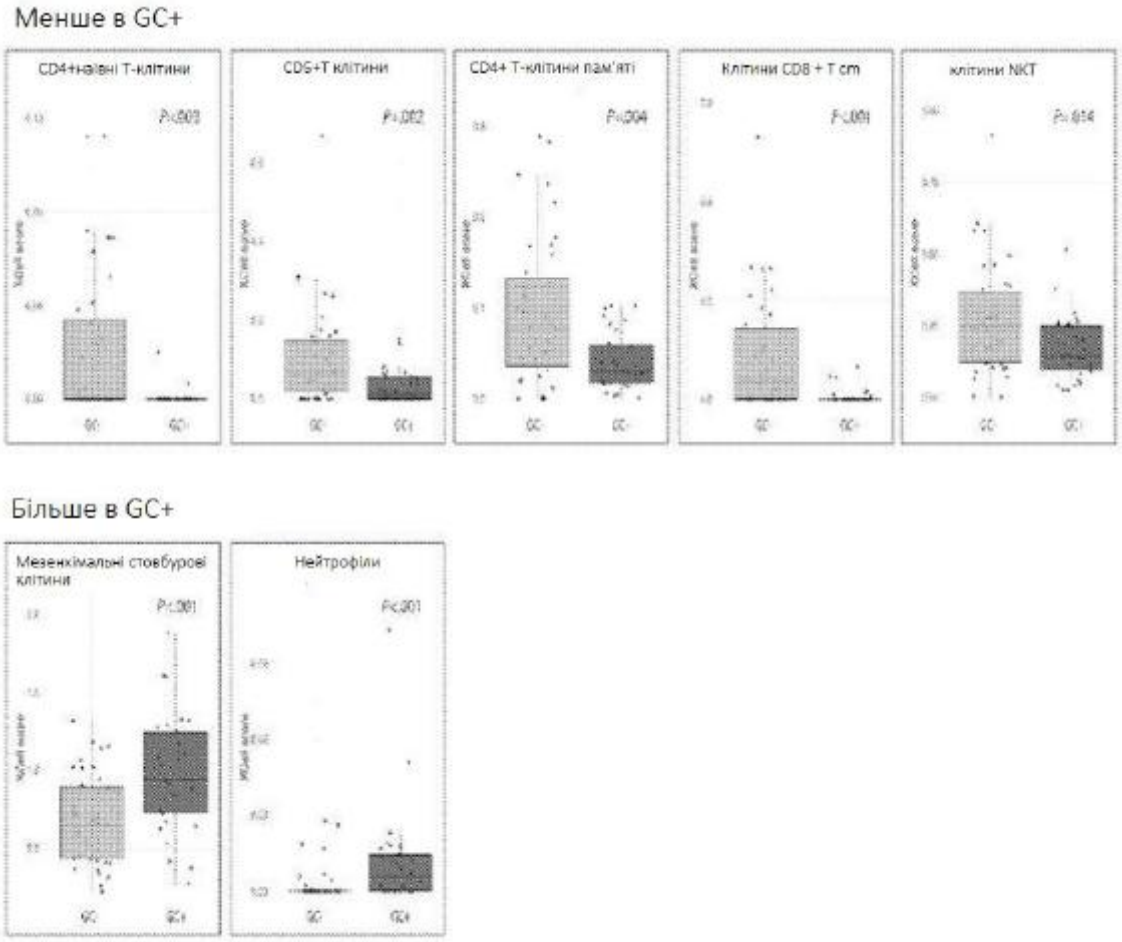
7. Фармацевтична композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що сполука є релакорилантом, а інгібітор контрольної точки антитіла є антитілом, ефективним проти CTLA-4.

8. Фармацевтична композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що сполука є релакорилантом, а інгібітор контрольної точки антитіла є антитілом, ефективним проти PD-L1.

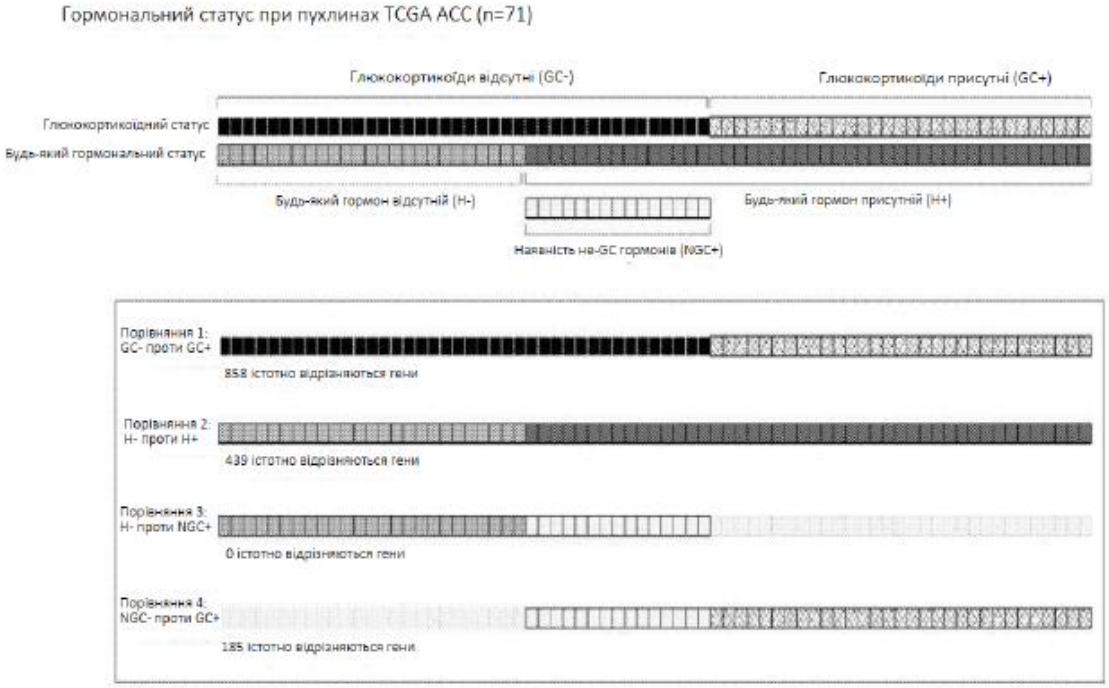
9. Фармацевтична композиція за п. 5, яка **відрізняється** тим, що сполука є релакорилантом, а інгібітор контрольної точки антитіла є антитілом, ефективним проти PD-L2.



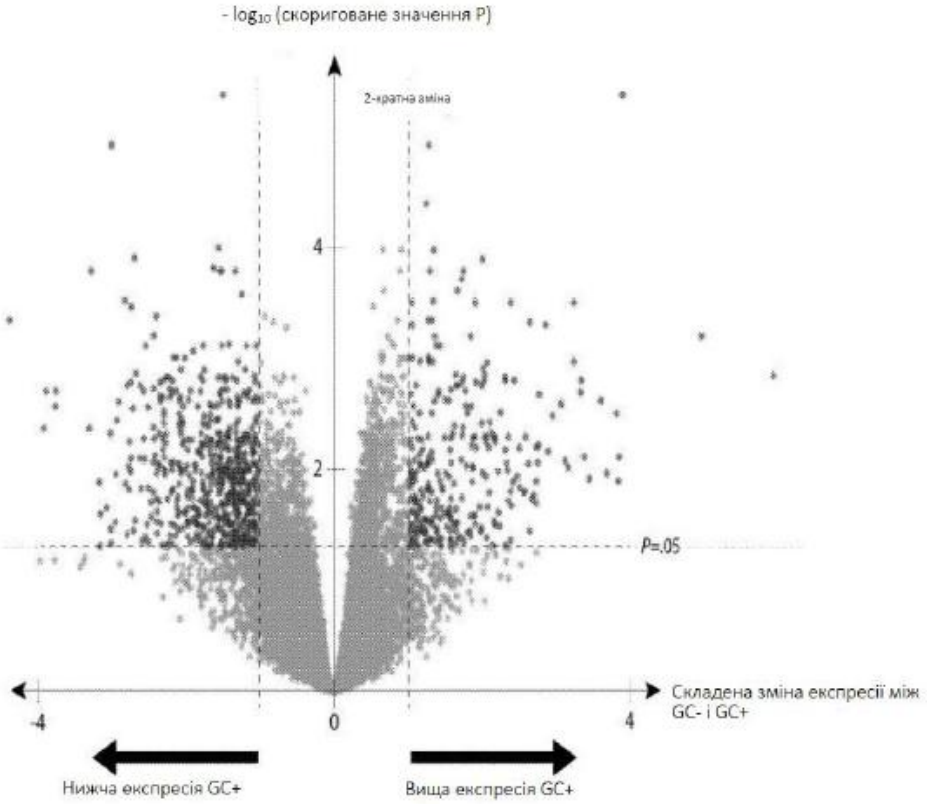
Фіг. 1


Менше в GC+
CD4+наївні Т-клітини
CD8+Т клітини
CD4+ Т-клітини пам'яті
Клітини CD8 + Т cm
клітини NKT
Більше в GC+
Мезенхімальні стовбурові клітини
Нейтрофіли

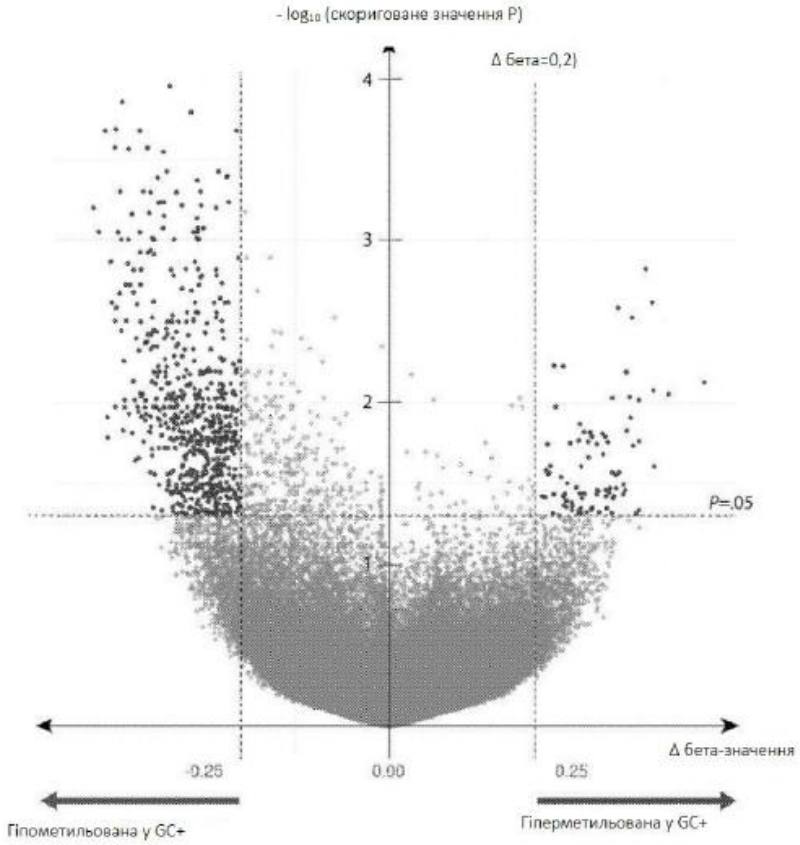
Фіг. 2


Гормональний статус при пухлинах TCGA ACC (n=71)
Глюкокортикоїди відсутні (GC-)
Глюкокортикоїди присутні (GC+)
Глюкокортикоїдний статус
Будь-який гормональний статус
Будь-який гормон відсутній (H-)
Будь-який гормон присутній (H+)
Наявність не-GC гормонів (NGC+)
Порівняння 1: GC- проти GC+
858 істотно відрізняються гени
Порівняння 2: H- проти H+
439 істотно відрізняються гени
Порівняння 3: H- проти NGC+
0 істотно відрізняються гени
Порівняння 4: NGC- проти GC+
185 істотно відрізняються гени

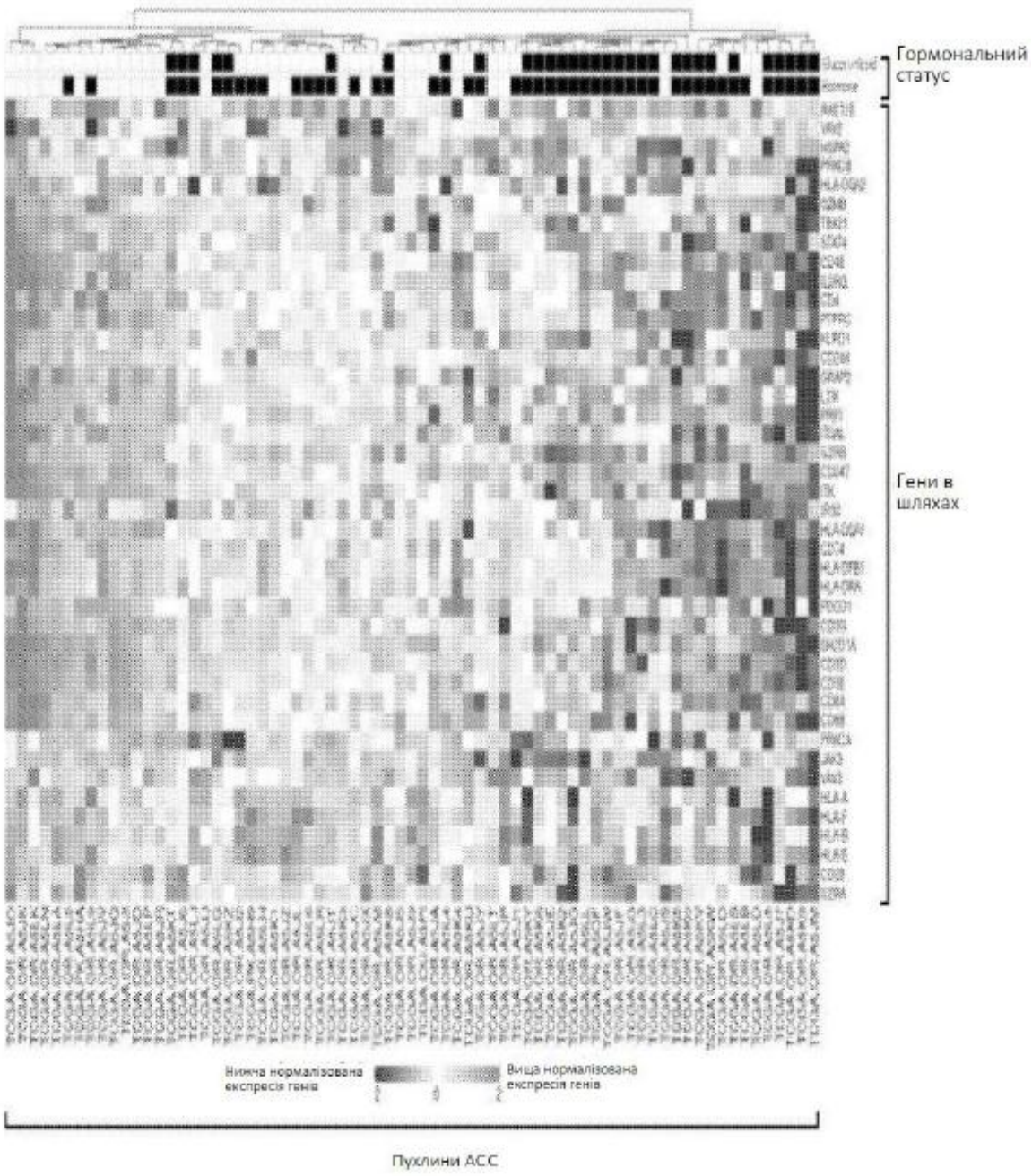
Фіг. 3А


- log10 (скориговане значення P)
2-кратна зміна
4
2
P=.05
-4
0
4
Складена зміна експресії між GC- і GC+
Нижча експресія GC+
Вища експресія GC+

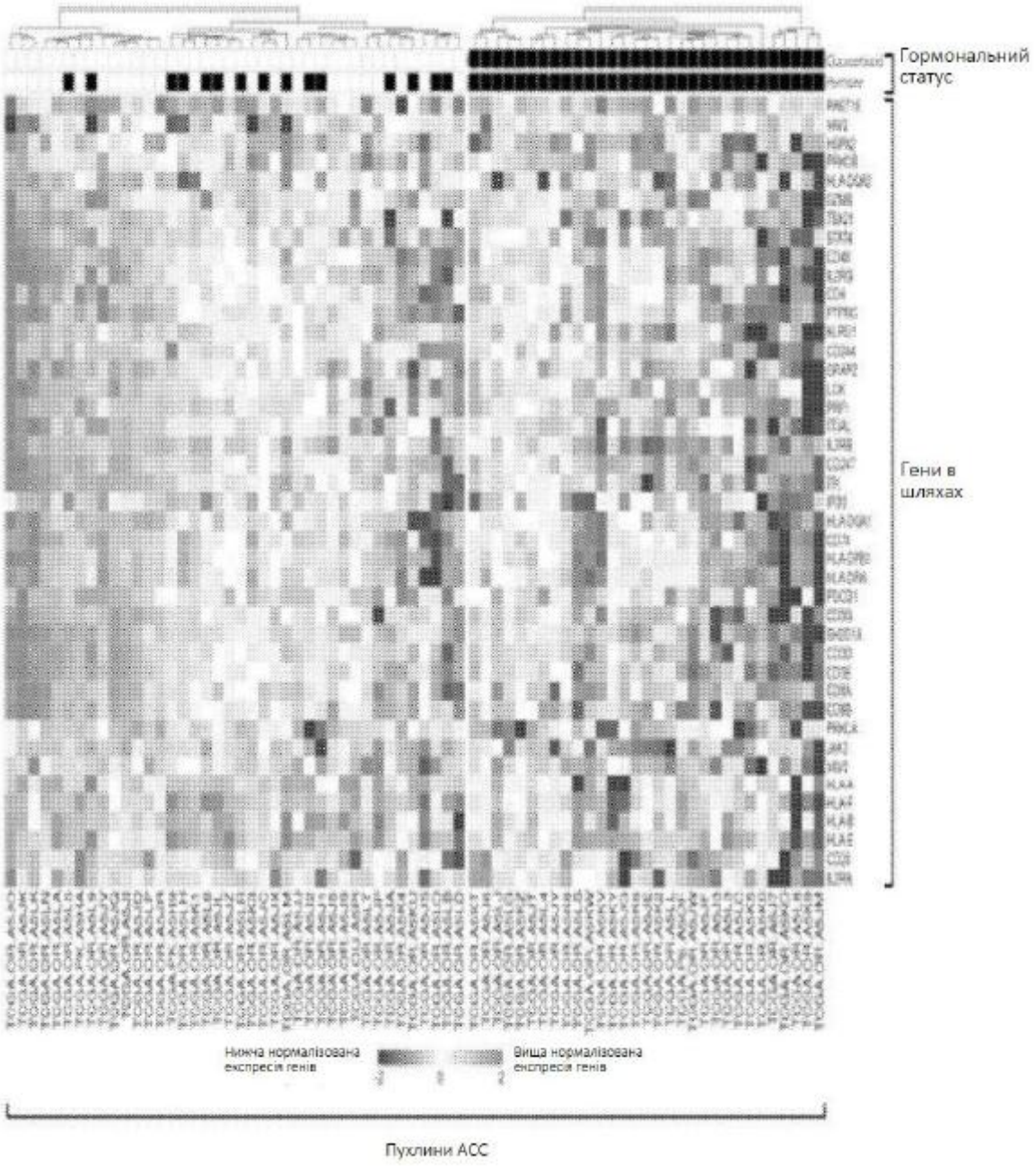
Фіг. 3B


- log10 (скориговане значення P)
Δ бета=0,2)
4
3
2
1
P=.05
-0.25
0.00
0.25
Δ бета-значення
Гіпометильована у GC+
Гіперметильована у GC+

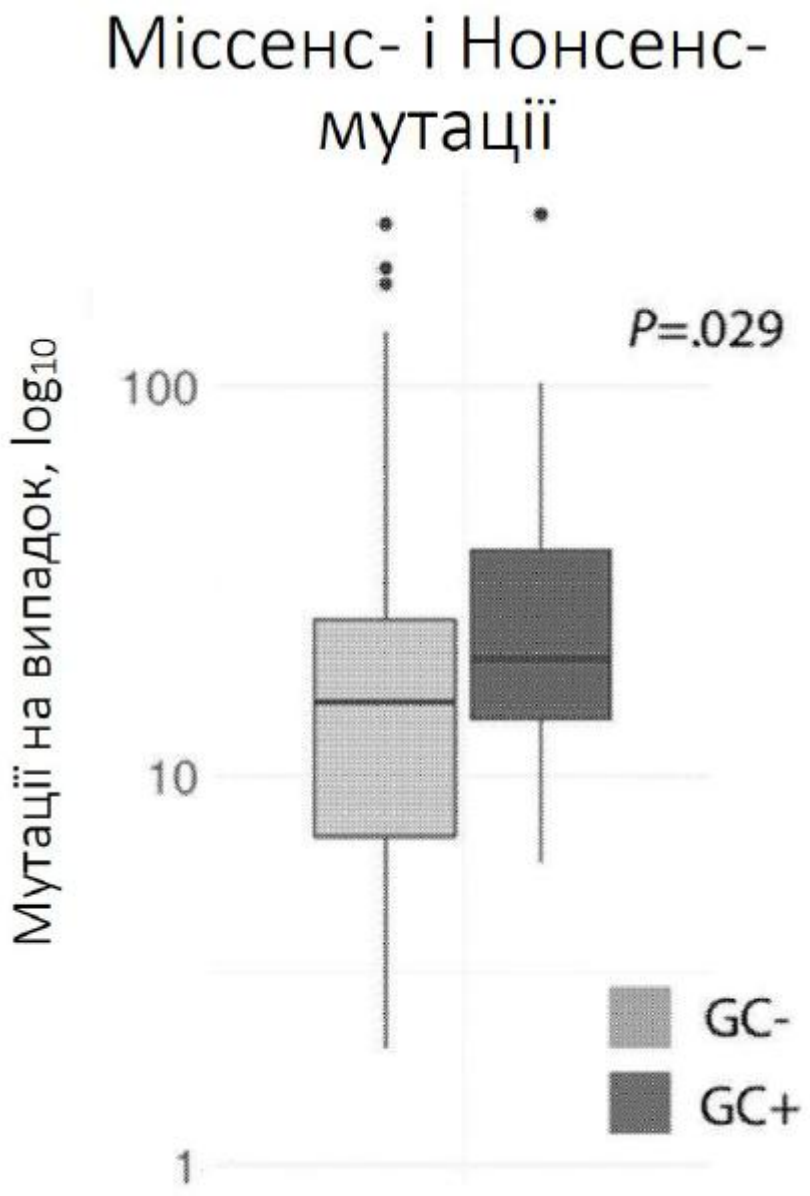
Фіг. 4


Гормональний статус
Гени в шляхах
Нижча нормалізована експресія генів
Вища нормалізована експресія генів
Пухлини ACC

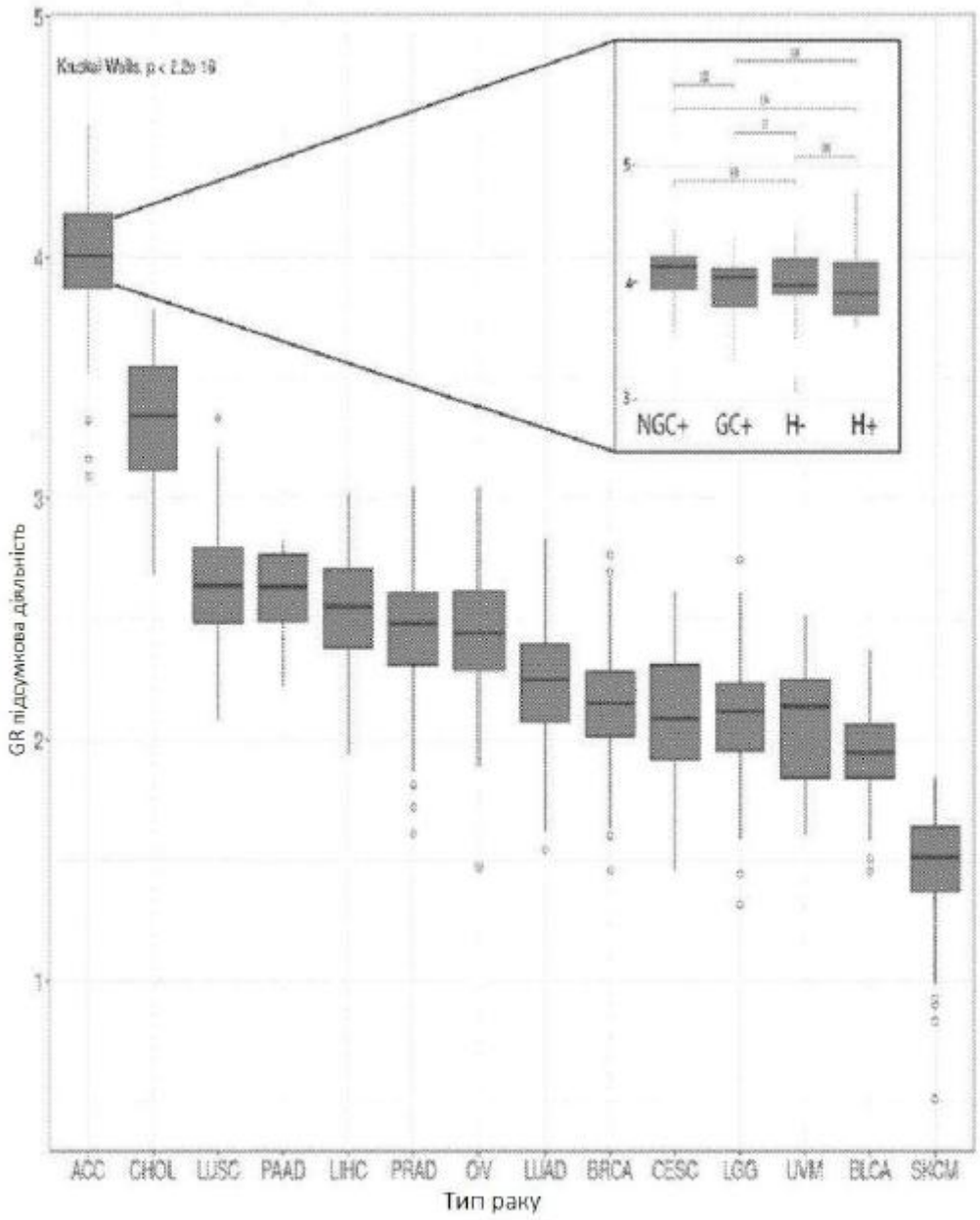
Фіг. 5


Гормональний статус
Гени в шляхах
Нижча нормалізована експресія генів
Вища нормалізована експресія генів
Пухлини ACC

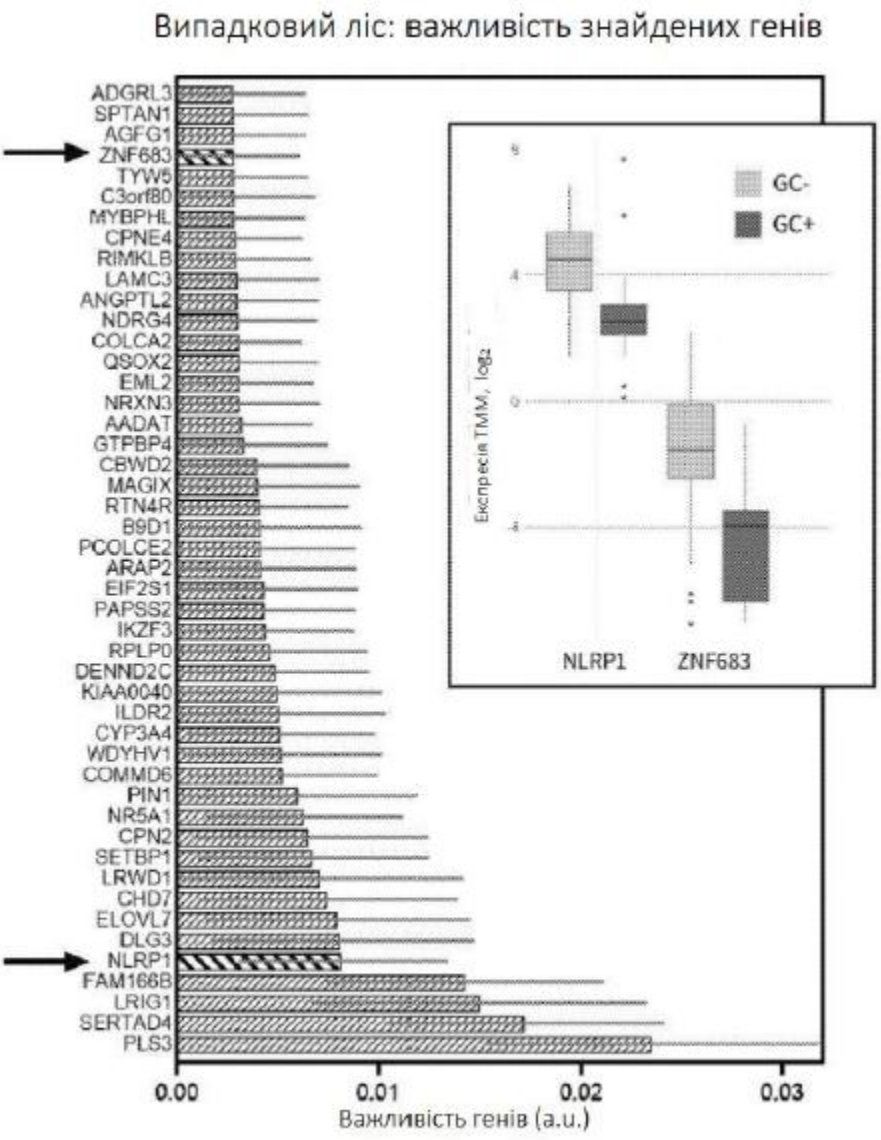
Фіг. 6


Міссенс- і Нонсенс-мутації
P=.029
Мутації на випадок, log10
100
10
1
GC-
GC+

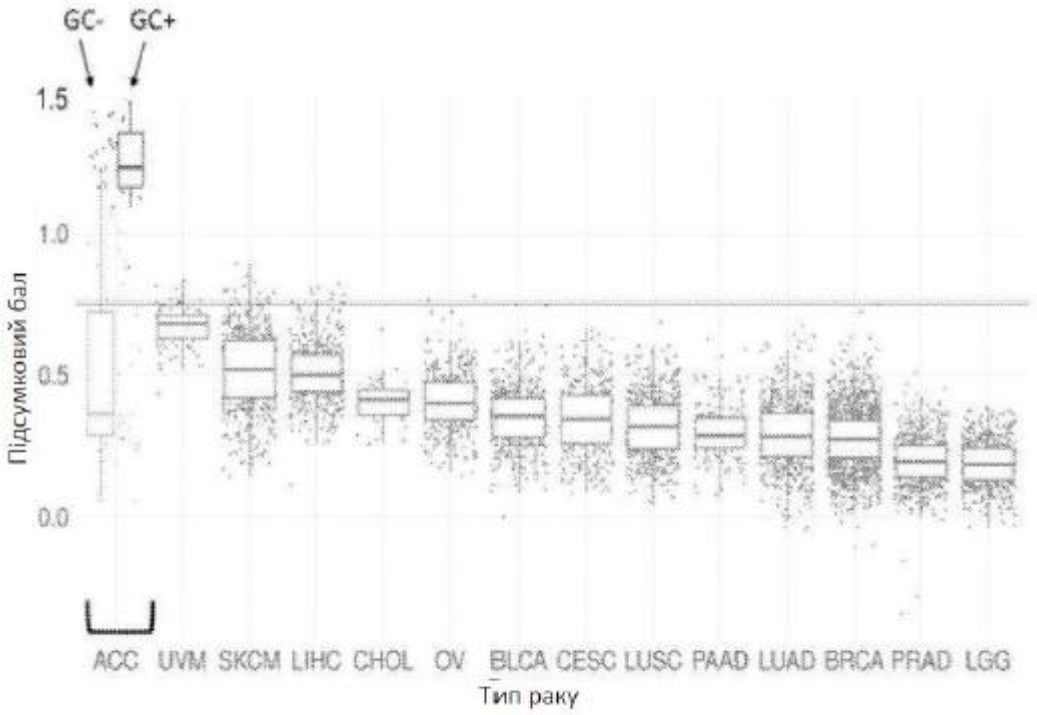
Фіг. 7


GR підсумкова дієльність
Тип раку
ACC
CHOL
LUSC
PAAD
LIHC
PRAD
OV
LUAD
BRCA
CESC
LGG
UVM
BLCA
SKCM
NGC+
GC+
H-
H+

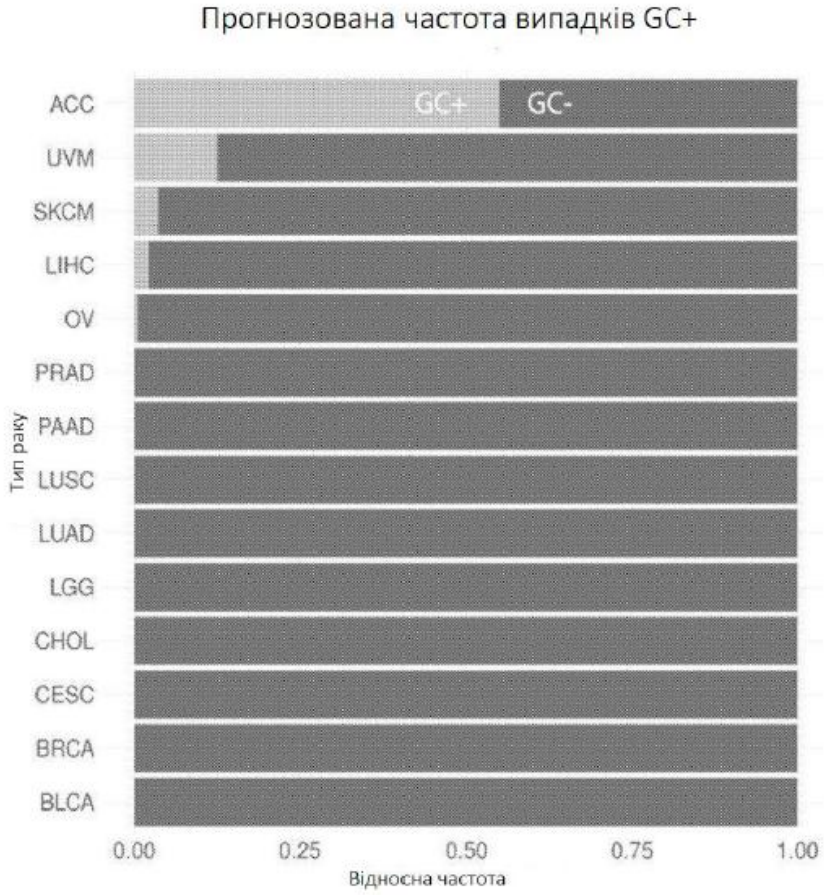
Фіг. 8


Випадковий ліс: важливість знайдених генів
ADGRL3
SPTAN1
AGFG1
ZNF683
TYW5
C3orf80
MYBPHL
CPNE4
RIMKLB
LAMC3
ANGPTL2
NDRG4
COLCA2
QSOX2
EML2
NRXN3
AADAT
GTPBP4
CBWD2
MAGIX
RTN4R
B9D1
PCOLCE2
ARAP2
EIF2S1
PAPSS2
IKZF3
RPLP0
DENND2C
KIAA0040
ILDR2
CYP3A4
WDYHV1
COMMD6
PIN1
NR5A1
CPN2
SETBP1
LRWD1
CHD7
ELOVL7
DLG3
NLRP1
FAM166B
LRIG1
SERTAD4
PLS3
0.00
0.01
0.02
0.03
Важливість генів (a.u.)
GC-
GC+
Експресія TMM, log2
NLRP1
ZNF683

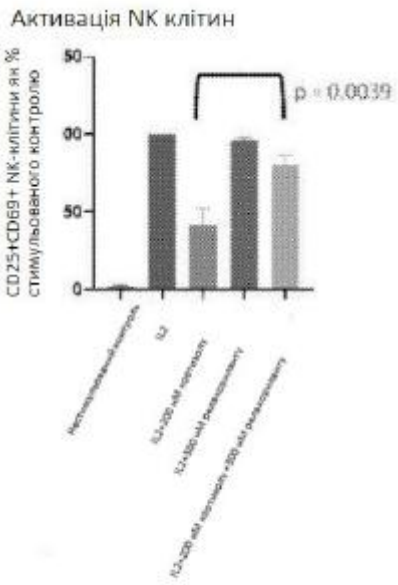
Фіг. 9



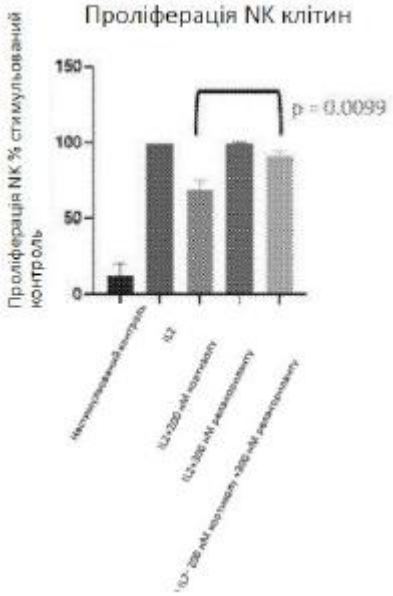
Фіг. 10A



Фіг. 10B

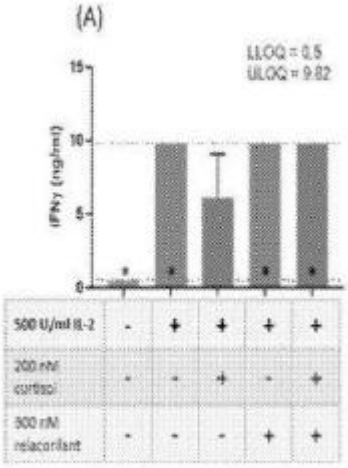


Фіг. 11A



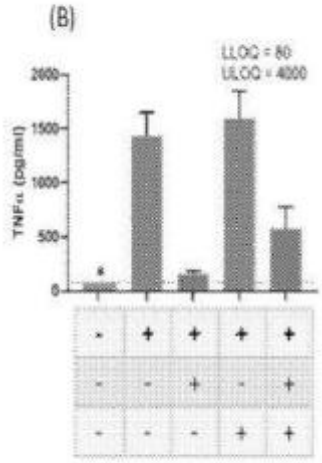
Фіг. 11B

INFγ

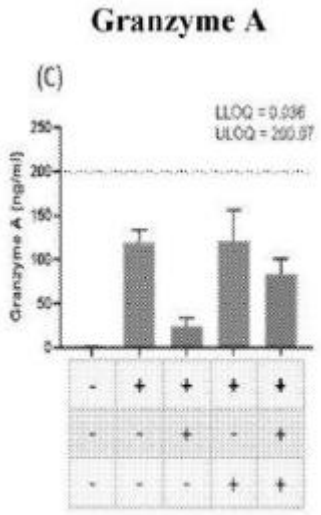


Фіг. 12A

TNFα

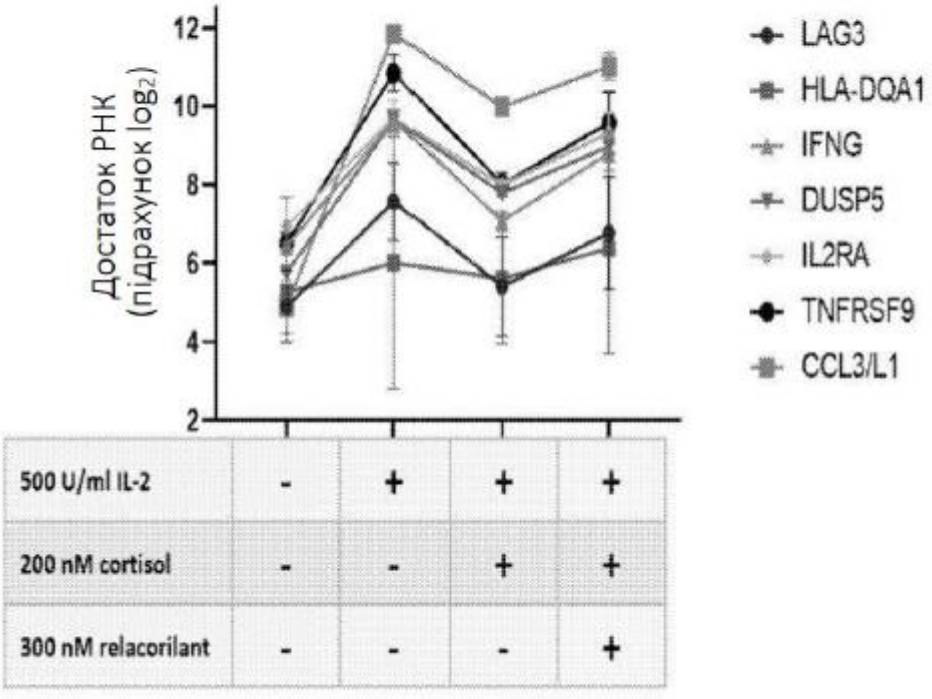


Фіг. 12B

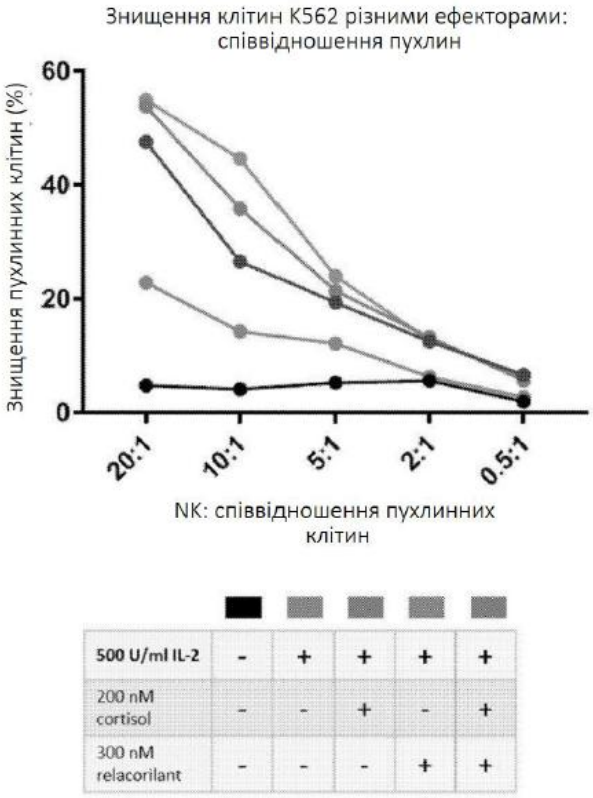


Фіг. 12C

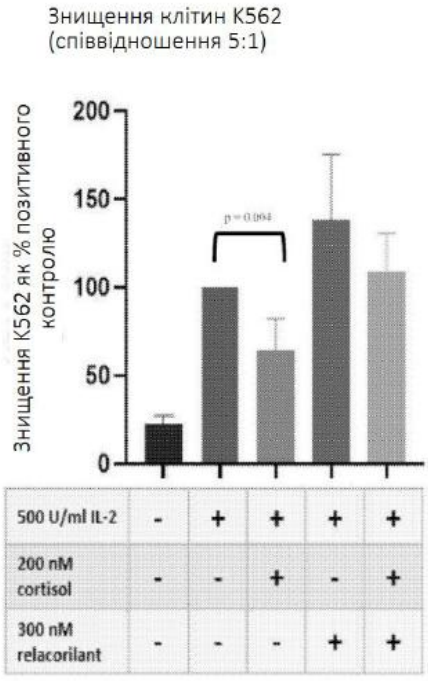
Клітини NK



Фіг. 12D



Фіг. 13A



Фіг. 13B

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601