



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118846** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/4184** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61K 31/5377** (2006.01)  
**A61P 35/00**

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2015 10275**  
(22) Дата подання заявки: **19.03.2014**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2019**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/804,056**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **21.03.2013**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.01.2016, Бюл.№ 1**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2019, Бюл.№ 6**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/ІВ2014/059975, 19.03.2014**  
(72) Винахідник(и):  
**Капонігро Джордано (US),  
Стьюарт Даррін (US),  
де Парсеваль Лор (CH)**

(73) Власник(и):  
**НОВАРТИС АГ,**  
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland (CH)  
(74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO2012095505, A1, 19.07.2012  
WO2012068468, A1, 24.05.2012  
WO03077914, A1, 25.09.2003  
WO2006053201, A2, 18.05.2006  
EP2570127, A1, 20.03.2013  
WO2012178038, A1, 27.12.2012  
WO2009143211, A2, 26.11.2009  
FLAHERTY KEITH T ET AL, "Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (201211), vol. 367, no. 18, ISSN 0028-4793, pages 1694 - 1703, XP002725869 [Y] 1-3,15 \* the whole document \*  
SU FEI ET AL, "Resistance to Selective BRAF Inhibition Can Be Mediated by Modest Upstream Pathway Activation", CANCER RESEARCH, (201202), vol. 72, no. 4, ISSN 0008-5472, pages 969 - 978, XP002725870 [Y] 1-3,15 \* the whole document, in particular page 974, column 2 \*

**UA 118846 C2**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
 K S M SMALLEY ET AL, "Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma", BRITISH JOURNAL OF CANCER, (20090120), vol. 100, no. 3, doi:10.1038/sj.bjc.6604891, ISSN 0007-0920, pages 431 - 435, XP055123646 [Y] 1-3,15 \* the whole document, in particular the chapter "Conclusion" \*  
 JACK MCCAIN, "The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma.", P&T, (201302), vol. 38, no. 2, ISSN 1052-1372, pages 96 - 108, XP055093262 [Y] 1-3,15 \* the whole document, in particular page 105, column 2, chapter "Combination Therapy" and chapter "Conclusion" \*  
 RYAN J. SULLIVAN ET AL, "Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (20130102), vol. 49, no. 6, doi:10.1016/j.ejca.2012.11.019, ISSN 0959-8049, pages 1297 - 1304, XP055082343 [Y] 1-3,8-12,15 \* the whole document, in particular page 1299, column 2, first paragraph \*  
 SIMON GIROUX, "Overcoming acquired resistance to kinase inhibition: The cases of EGFR, ALK and BRAF", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, (201301), vol. 23, no. 2, doi:10.1016/j.bmcl.2012.11.037, ISSN 0960-894X, pages 394 - 401, XP055123645 [Y] 1-3,15 \* page 399 \*  
 E. HUILLARD ET AL, "Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, (20120514), vol. 109, no. 22, doi:10.1073/pnas.1117255109, ISSN 0027-8424, pages 8710 - 8715, XP055080274 [Y] 1,2,4-7,15 \* the whole document, in particular page 8712 - page 8714 \*

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
 JOCELYN HOLASH, "Preclinical strategies to help better identify responder populations in the clinic", NORCAL SOT FALL SYMPOSIUM: NEW FRONTIERS IN ONCOLOGY DRUG DEVELOPMENT, (20120927), XP055139652 [Y] 1,2,5,8-12,15\* page 8 \* \* page 17, right figure \*  
 E. VERGANI ET AL, "Identification of MET and SRC Activation in Melanoma Cell Lines Showing Primary Resistance to PLX4032", NEOPLASIA, (201112), vol. 13, no. 12, doi:10.1593/neo.111102, pages 1132 - 1142, XP055081482 [Y] 1,2,6,9,11,12,15 \* page 1136, column 2 - page 1137, column 1 \* \* figures 5,6 \* \* page 1141, column 1 \*  
 "2011 International Melanoma Congress", PIGMENT CELL & MELANOMA RESEARCH, (20111010), vol. 24, no. 5, doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00909.x, ISSN 1755-1471, pages 990 - 1075, XP055082293 [Y] 1,2,6,9-12,15 \* Abstract SMR-P91; page 1049 \*  
 THOMAS METZNER ET AL, "Fibroblast Growth Factor Receptors as Therapeutic Targets in Human Melanoma: Synergism with BRAF Inhibition", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, (20110714), vol. 131, no. 10, doi:10.1038/jid.2011.177, ISSN 0022-202X, pages 2087 - 2095, XP055141652 [Y] 1,2,7,10-12,15 \* the whole document, in particular figures 1, 4 and 6 \*  
 JURGEN WOLF ET AL, "A phase I dose escalation study of NVP-BGJ398, a selective pan FGFR inhibitor in genetically preselected advanced solid tumors", PROCEEDINGS OF THE 103RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; 2012 MAR 31-APR 4; CHICAGO, IL. PHILADELPHIA (PA), (20120402), XP055141768 [Y] 10-12,15 \* the whole document \*

#### (54) КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ

##### (57) Реферат:

Запобігання резистентності до інгібітору B-Raf для лікування проліферативного захворювання шляхом отримання зразка пухлини у пацієнта та його тестування на наявність генетичних змін в панелі генів, що включає BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16, та застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який долає резистентність до інгібітору B-Raf, причому другий інгібітор вибирають на підставі виявлених генетичних змін у зразку пухлини.

## СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується застосування інгібітору B-Raf в комбінації із другим інгібітором для лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в гені B-Raf, при цьому другий інгібітор вибирають на підставі генетичних змін, ідентифікованих у зразку пухлини.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Були досягнуті значні успіхи в розумінні молекулярних змін, пов'язаних із розвитком меланоми. Онкогенні мутації B-RAF, серин-треонінової протеїнкінази RAF/MEK/ERK сигнального шляху, зокрема, розповсюджені при меланомі, від 40 до 60 % меланом мають активуючу мутацію в B-Raf гені. Заміна глутамінової кислоти на валін в 600 амінокислоті (V600E мутація) представляє більш ніж 95 % описаних B-Raf мутацій. Ця мутація конститутивно активує B-Raf та "даунстрім" сигнальну трансдукцію в RAF/MEK/ERK сигнальному шляху, який проводить сигнали для проліферації ракових клітин та виживання. На додаток до меланоми, такі мутації B-Raf, як відомо, відбуваються при інших проліферативних захворюваннях, наприклад, колоректальному раку, раку щитовидної залози, зокрема, папілярному раку щитовидної залози, астроцитомі, раку підшлункової залози і нейрофіброматозах. Хоча значні результати, як відомо, мають місце, коли такі захворювання лікують за допомогою інгібітору B-Raf, розвиток резистентності до терапії з інгібітором B-Raf є типовим, часто відбуваючись протягом досить короткого періоду часу.

Є множина шляхів резистентності до лікування інгібітором B-Raf. Основні механізми призводять до реактивації RAF/MEK/ERK сигнального шляху в присутності інгібітору B-Raf. Ця реактивація може відбуватися через підвищену активність рецепторних тирозинкіназ (RTK) через ампліфікацію гена та надекспресію та/або продукування ліганду, набуття мутацій у генах NRAS та MEK1, обхідний шлях BRAF через надекспресію кіназ, таких як COT та RAF-1 (CRAF), експресію сплайс-варіантів мутантного алеля BRAF та підвищену експресію мутантного алеля BRAF внаслідок, наприклад, ампліфікації гена. На додаток, активація сигнальних шляхів виживання, які відрізняються від MAPK сигнального шляху, таких як сигнальна система PI3Kα, або активація RTK, таких як PDGFR-β та IGF-1R, або втрата гена PTEN також можуть відігравати важливу роль у резистентності. Інші механізми, через c-MET та сімейство FGFR RTK, є потенційними механізмами, які можуть сприяти резистентності до інгібіторів B-Raf при множинній меланомі.

Отримані дані, описані вище, підкреслюють важливість ідентифікації механізмів резистентності в режимі реального часу з метою розпочати доцільну комбіновану терапію на ранній стадії після рецидиву при лікуванні інгібітором B-Raf. Використання підходу на основі механізму співставлення генетичних змін, присутніх в пухлині пацієнта під час рецидиву в порівнянні з попереднім лікуванням, має бути можливим, щоб ідентифікувати ймовірні механізми резистентності. Це допоможе у виборі відповідної медикаментозної комбінованої терапії для конкретного пацієнта з метою ефективного уникнення резистентності. Даний винахід стосується підходу на основі механізму комбінованого лікування для розширення та поліпшення терапевтичних можливостей для пацієнтів з BRAF-мутантною прогресуючою або метастазуючою меланомою, яка має дуже поганий прогноз після розвитку резистентності до інгібіторів B-Raf.

## КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, інгібітором B-Raf, коли резистентність до інгібітору B-Raf знижується:

(a) визначенням генетичних змін у зразку пухлини, взятому у пацієнта,

(b) застосуванням комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, для пацієнта, причому другий інгібітор вибирають на основі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини.

## КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1 ілюструє ефект Сполуки формули (I) та Сполуки F як одиночних засобів та в комбінації на ріст моделі клітинної лінії HT-29 in vivo, як описано в Прикладі 4.

Фігура 2 ілюструє ефект Сполуки формули (I) та Сполуки F як одиночних засобів та в комбінації на ріст моделі клітинної лінії RKO in vivo, як описано в Прикладі 4.

Фігура 3 ілюструє ефект комбінування інгібітору RAF (Сполука Формули I) з інгібітором FGFR, Сполука H, на проліферацію двох, отриманих із меланоми, клітинних ліній, які несуть BRAFV600E-кодуючу алель BRAF. Проілюстровано ріст у реальному часі клітинних ліній (Вгорі А) COLO 741 та (Внизу В) SK-MEL-5, виміряний за допомогою клітинного аналізатора на основі повного опору xCELLigence, як описано в Прикладі 5. При цьому зазначені FGF2 та Сполука H

були додані в культивацийне середовище в концентрації 100 нг/мл та 1 мкМ, відповідно. Сполука Формули (I) була використана в концентрації 500 нМ (А) та 100 нМ (В).

Фігура 4 ілюструє ефект комбінування Сполуки Формули (I) з інгібітором FGFR, Сполуки Н та ліганду FGFR FGF2 на сигналінг двох мутантних по BRAFV600E, отриманих із меланоми, клітинних ліній *in vitro*. Проілюстровано вестерн-аналіз обох фосфорилуваних та тотальних АКТ, ERK1/2 та MEK1/2 протеїнів, виділених із (А) COLO 74 та (В) SK-MEL-5 клітин після обробки Сполукою Формули (I) (100 нМ), FGF2 (100 нг/мл) та Сполукою Н (1мкМ). Клітини обробляли протягом 2 та 24 годин засобами окремо та в комбінації, як обговорювалося в Прикладі 5.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, який включає:

(а) отримання зразка пухлини від пацієнта та тестування на генетичні зміни в панелі генів, що включає BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA і P16.

(b) застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, при цьому другий інгібітор вибраний на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини.

В одному варіанті реалізації винаходу проліферативне захворювання являє собою рак. Термін "рак" використовується в даному документі для позначення широкого спектру пухлин, у тому числі всіх солідних пухлин і гематологічних злоякісних новоутворень. Приклади таких пухлин включають, але не обмежуються цим, доброякісні або злоякісні пухлини головного мозку, легенів (зокрема дрібноклітинний рак легенів і недрібноклітинний рак легенів), плоскоклітинний рак, рак сечового міхура, шлунка, підшлункової залози, молочної залози, голови і шиї, рак нирок, ниркових мисок, сечоводу, яєчників, передміхурової залози, товстої кишки, стравоходу, яєчок, гінекологічний рак (наприклад, маткові саркоми, карцинома фаллопієвих труб, рак ендометрія, шийки матки, піхви або вульви), щитовидної залози, підшлункової залози, кісток, шкіри, меланому, матки, яєчників, прямої кишки, ануса, товстої кишки, яєчок, хворобу Ходжкіна, рак стравоходу, тонкої кишки, ендокринної системи (наприклад, щитовидної залози, паращитовидної залози або наднирників), саркому м'яких тканин, рак уретри, статевого члена, лейкемію, лімфому, новоутворення центральної нервової системи, саркому, мієлому, рак жовчних шляхів, печінки, нейрофіброматоз, гострий мієлобластний лейкоз (ГМЛ), мієлодиспластичні синдроми (МДС) і саркому Капоші.

У додатковому варіанті реалізації винаходу проліферативне захворювання є меланою, раком легенів (включаючи недрібноклітинний рак легенів (НДРЛ)), колоректальним раком (КРР), раком молочної залози, раком нирки, таким як, наприклад, нирково-клітинний рак (НКТ), раком печінки, раком ендометрія, гострим мієлобластним лейкозом (ГМЛ), мієлодиспластичним синдромом (МДС), раком щитовидної залози, зокрема, папілярним раком щитовидної залози, раком підшлункової залози, нейрофіброматозом або гепатоцелюлярною карциномою.

У додатковому варіанті реалізації винаходу проліферативне захворювання являє собою солідну пухлину. Термін "солідна пухлина" означає особливо меланому, рак молочної залози, рак яєчників, рак товстої кишки і шлунково-кишкового тракту в цілому, рак шийки матки, рак легенів (в тому числі дрібноклітинний рак легенів і недрібноклітинний рак легенів), рак голови і шиї, рак сечового міхура, рак передміхурової залози або саркому Капоші.

Зокрема, даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією V600 в B-Raf, наприклад, мутацією V600E. Проліферативні захворювання, які часто характеризуються такою мутацією, включають меланому, рак товстої кишки, рак щитовидної залози, зокрема, папілярний рак щитовидної залози, астроцитому, рак підшлункової залози та нейрофіброматоз. Даний винахід особливо стосується такого способу, в якому проліферативне захворювання являє собою меланому, що характеризується мутацією V600 в B-Raf, наприклад, V600E, V600K або V600G мутацією.

Інгібітори B-Raf та їхнє використання для лікування проліферативних захворювань відомі в даній галузі техніки. Вемурафеніб (PLX4032) являє собою інгібітор BRAF, який був схвалений Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) для лікування пацієнтів з меланою, чиї пухлини експресують BRAF V600E. Сорафеніб та дабрафеніб та CEP-32496 додаткові відомі інгібітори B-Raf. Піридилові ефіри бензімідазолу, які описано в патенті США № 7482367, який включено в даний документ у повному об'ємі за допомогою посилання, є інгібіторами B-Raf, які використовують в даних комбінаціях, зокрема, RAF265. Піразоло-піримідинові похідні, які описано в WO 2011/025927 та які включено в даний

документ у повному об'ємі за допомогою посилання, являють собою інший клас інгібіторів B-Raf, придатних для даних комбінацій.

- Відповідний другий інгібітор для комбінування з інгібітором B-Raf вибрано відповідно до Таблиці 1 для лікування пацієнта на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини.
- 5 Генетичні зміни можуть бути результатом ампліфікації гена, мутацій в гені або втрати активності гена.

Таблиця 1

Генетичні зміни			Ліки, що надаються в комбінації з інгібітором B-Raf
Ампліфікація	Мутація	Втрата гена	
BRAF CRAF EGFR	MAP2K1 MAP2K2 NRAS KRAS HRAS		Інгібітор Mek1/2
CCND1 CDK4	CDK4	P16	Інгібітор CDK 4
HER2 IGF-1R	PTEN PIK3CA	PTEN	Інгібітор кінази PI3
cMET			Інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met
FGFR1 FGFR2 FGFR3			Інгібітор FGFR кінази
Або немає змін у будь-якому із вищевказаних генів			Інгібітор Mek1/2

- Інформація, що стосується генів, які ідентифіковані в Таблиці 1, їхніх послідовностей та асоційованих протеїнів, відома фахівцям у даній галузі техніки та зустрічається у загальнодоступних базах даних, наприклад, тих, які надані Національним центром біотехнологічної інформації, Національною бібліотекою медицини США 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894USA, таких як GENE (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) або Управлінням біологічних та екологічних досліджень Наукового відділу Міністерства енергетики США, Інформація про проект Геном Людини (URL: <http://genomics.energy.gov/>).

- Комбінована медикаментозна терапія включає застосування кожного з препаратів у комбінованій терапії в кількості, достатній для забезпечення спостережуваного поліпшення порівняно з вихідними, клінічно спостережуваними симптомами та ознаками захворювання, яке лікувалось комбінацією. Препарати можуть надаватися окремо (в порядку хронологічного чергування, особливо, суворо послідовним чином) в таких часових інтервалах, які найбільш бажані, таким чином, що у пацієнта проявляється (переважно синергетична) взаємодія (сумісний терапевтичний ефект), зокрема, коли резистентність до лікування інгібітором B-Raf у пацієнта подолана або знижена.

- Термін "фармацевтично ефективна кількість" або "клінічно ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" комбінації терапевтичних засобів являє собою кількість, достатню для забезпечення спостережуваного поліпшення, у порівнянні з вихідними, клінічно спостережуваними симптомами та ознаками захворювання, яке лікувалось комбінацією.

- Загальні терміни, що використовуються в даному документі, визначаються наступними значеннями, якщо явно не вказано інше.

- Терміни "містить" та "включає" використовуються в даному документі в їхньому відкритому для доповнення значенні та такому, що не обмежує сенс, якщо не вказано інше.

- Слова в однині та схожі посилання в контексті опису винаходу (особливо в контексті нижченаведеної формули винаходу) слід тлумачити з метою охоплення як однини, так і множини, якщо в даному документі не вказано інше або таке, що явно суперечить контексту. Якщо форма множини використовується для сполук, солей тощо, це слід розуміти також як одну сполуку, сіль і т. п.

- Термін "комбінація", "терапевтична комбінація", "комбінована терапія" або "фармацевтична комбінація", який використовується в даному документі, визначає або фіксовану комбінацію в одній одиниці дози лікарської форми, або набір компонентів або інструкцій для комбінованого введення, при цьому інгібітор B-Raf та другий інгібітор можуть бути введені незалежно один від одного в той же час або окремо протягом часових інтервалів, які дозволяють партнерам по

комбінації виявляти кооперативний, наприклад, синергетичний ефект.

Термін "фармацевтична композиція" визначено в даному документі відносно суміші або розчину, що містить щонайменше один терапевтичний засіб для введення суб'єкту, наприклад, ссавцю або людині, з метою запобігання або лікування конкретного захворювання або стану, що впливає на ссавця.

Термін "фармацевтично прийнятний" визначено в даному документі відносно тих сполук, матеріалів, композицій та/або форм дозування, які в рамках обґрунтованого медичного висновку підходять для контакту з тканинами суб'єкта, наприклад, ссавця або людини, без надмірної токсичності, збудження алергічної реакції та інших проблемних ускладнень, співрозмірних з доцільним відношенням користь/ризик.

Термін "фармацевтично прийнятна сіль", який використовується в даному документі, якщо не вказано інше, включає солі кислотних та основних груп, які можуть бути присутніми у сполуках за даним винаходом. Сполуки даного винаходу, які є основними за природою, здатні утворювати широке різноманіття солей з різними неорганічними та органічними кислотами. Кислоти, які можуть бути використані для приготування фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей таких основних сполук за даним винаходом, є такими, які утворюють нетоксичні кислотно-адитивні солі, тобто солі, які містять фармацевтично прийнятні аніони, такі як ацетат, бензоат, бромід, хлорид, цитрат, фумарат, гідробромід, гідрохлорид, йодид, лактат, малеат, манделат, нітрат, оксалат, саліцилат, сукцинат та тартратні солі. Якщо не вказано інше, терапевтичні засоби, що використовуються у винайдених способах, вводять у вільній формі або у формі фармацевтично прийнятної солі.

Термін "комбінований препарат" визначено в даному документі особливо відносно "набору компонентів" в тому сенсі, що партнери по комбінації (а) та (b), як визначено вище, можуть дозуватися незалежно або шляхом використання різних фіксованих комбінацій з різними кількостями партнерів по комбінації (а) та (b), тобто одночасно або в різні моменти часу. Компоненти із набору компонентів надалі можуть, наприклад, бути введені одночасно або в порядку хронологічного чергування, тобто в різні моменти часу та з однаковими або різними часовими інтервалами для будь-якого компонента із набору компонентів. Співвідношення сукупних кількостей партнера по комбінації (а) до партнера по комбінації (b) для введення в складі комбінованого препарату може варіювати, наприклад, для того, щоб справлятися із потребами субпопуляції пацієнтів, які будуть проходити лікування, чи потребами одного пацієнта.

Терміни "сумісне введення", "комбінована терапія" або "комбіноване введення", що використовуються у даному документі, охоплюють у своєму значенні введення вибраних терапевтичних засобів одному пацієнтові та передбачають схеми лікування, при яких засоби необов'язково вводять одним і тим же способом введення або в той же самий час.

Терміни "лікуючий" або "лікування", які використовуються у даному документі, включають полегшення лікування, зменшення або пом'якшення щонайменше одного симптому у суб'єкта або здійснення уповільнення прогресування захворювання. Наприклад, лікування може призвести до зменшення одного або декількох симптомів захворювання або повноговилікування захворювання, такого як рак. У контексті даного винаходу термін "лікувати" також означає затримку, відстрочення настання (тобто періоду, що передує клінічному прояву захворювання) та/або зниження ризику розвитку або загострення захворювання. Термін "захист" використовується в даному документі для позначення запобігання, затримки або лікування, або, у відповідних випадках, всього разом, розвитку або тривалості, або загострення захворювання у суб'єкта.

Терміни "суб'єкт" або "пацієнт", які використовуються у даному документі, належить, зокрема, до людини, наприклад, людини, яка страждає, знаходиться в групі ризику або потенційно здатна постраждати від проліферативного захворювання. Однак не виключеним є застосування для лікування ссавців, наприклад, собак, корів, коней, свиней, овець, кіз, кішок, мишей, кроликів, щурів та трансгенних, відмінних від людини, тварин.

Термін "близько" або "приблизно" повинен мати значення в межах 10 %, більш переважно в межах 5 %, від даної величини або діапазону.

Таким чином, даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланоною, яка характеризується наявністю мутації V600 у B-Raf, який включає:

(а) отримання зразка пухлини у пацієнта та тестування на наявність генетичної зміни в гені, вибраному із групи, що включає BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA і P16.

(b) застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, при цьому другий інгібітор вибирають на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини відповідно до Таблиці 1, зокрема, при цьому:

5 (i) другий інгібітор являє собою інгібітор Мек 1/2, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR, або

(ii) другий інгібітор являє собою інгібітор CDK 4, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в CCND1, CDK4 або P16, або

(iii) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази PI3, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в HER2, IGF-1R, PTEN або PIK3CA, або

10 (iv) другий інгібітор являє собою інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в cMET,

(v) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази FGFR, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в FGFR1, FGFR2 або FGFR3.

15 Таким чином, даний винахід додатково стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

(a) отримання зразка пухлини у пацієнта та виявлення генетичної зміни в гені, вибраному із групи, що включає BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR;

20 (b) застосування комбінованої медикаментозної терапії відносно пацієнта, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який являє собою інгібітор Мек 1/2.

Даний винахід також стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

25 (b) отримання зразка пухлини у пацієнта та виявлення генетичної зміни в гені, вибраному з групи, що включає CCND1, CDK4 або P16;

(d) застосування комбінованої медикаментозної терапії відносно пацієнта, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який являє собою інгібітор CDK 4.

30 Даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

(a) отримання зразка пухлини у пацієнта після прогресування захворювання та виявлення генетичної зміни в гені, вибраному із групи, що включає HER2, IGF-1R, PTEN або PIK3CA,

35 (b) застосування комбінованої медикаментозної терапії відносно пацієнта, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який являє собою інгібітор PI3 кінази.

Даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

40 (a) отримання зразка пухлини у пацієнта та виявлення генетичної зміни в гені, вибраному із групи, що включає cMET,

(b) застосування комбінованої медикаментозної терапії відносно пацієнта, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який являє собою інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met.

Даний винахід стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

45 (a) отримання зразка пухлини у пацієнта та виявлення генетичної зміни в гені, вибраному із групи, що включає FGFR1, FGFR2 або FGFR3,

50 (b) застосування комбінованої медикаментозної терапії відносно пацієнта, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, який являє собою інгібітор кінази FGFR.

В істотному варіанті реалізації даного винаходу пацієнт попередньо проходив лікування із застосуванням монотерапії з інгібітором B-Raf. Зокрема, пацієнт проходить лікування із застосуванням монотерапії з інгібітором B-Raf із подальшою, встановленою відповідно до Таблиці 1, комбінованою медикаментозною терапією, до моменту прогресування захворювання.

55 У переважному варіанті реалізації інгібітор B-Raf безперервно вводять у вигляді монотерапії до моменту прогресування захворювання або до початку комбінованої медикаментозної терапії та безперервне введення продовжується протягом лікування із застосуванням комбінованої медикаментозної терапії.

60 В іншому варіанті реалізації винаходу інгібітор B-Raf вводять у вигляді переривчастої схеми дозування, що означає, що інгібітор B-Raf вводять протягом періоду часу, за яким слідує період

часу, в якому лікування інгібітором B-Raf призупиняється. Наприклад, інгібітор Raf вводять щоденно протягом періоду 3 або 4 тижнів із наступним періодом в 1 або 2 тижні без лікування та цикл повторюється.

Прогресування захворювання оцінюють за допомогою відповідних клінічних критеріїв, таких як критерії RECIST. RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (Критерії оцінки відповіді при солідних пухлинах)) являє собою набір опублікованих правил, що дозволяють визначити, коли стан хворого на рак покращився ("відповідь"), залишився на тому ж рівні ("стабільний") або погіршився ("прогресія") під час лікування. Оригінальні критерії були опубліковані в лютому 2000 року в рамках міжнародного співробітництва, включаючи Європейську організацію з досліджень та лікування раку (ЕОДЛР), Національний інститут раку (NCI) США та Національний інститут ракових захворювань групи клінічних випробувань Канади. RECIST 1.1, опубліковані в січні 2009 року, оновлені до оригінальних критеріїв. Див. Eur. J. Cancer, 45, (2009) 228-247.

Механізм прогресування захворювання визначається шляхом співставлення генетичних змін, присутніх в пухлині пацієнта під час рецидиву, наприклад, у порівнянні з попередніми лікуванням. Генетичні зміни можуть бути результатом ампліфікації гена, мутацій в гені або втрати активності гена. Генетичні зміни визначаються способами, відомими в даній галузі техніки, як правило, відомими способами секвенування. У переважному варіанті реалізації порівнюються гени, вибрані із групи, що складається з B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16 у зразках пухлин, взятих під час рецидиву, в порівнянні з попереднім лікуванням.

Таким чином, даний винахід також стосується тестування зразка пухлини, взятого у пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, на предмет генетичних змін в панелі генів, що включає B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16 з метою визначення механізму прогресування захворювання після лікування інгібітором B-Raf.

Даний винахід також стосується способу діагностики з метою вибору другого інгібітору для подальшого комбінування з інгібітором B-Raf, при цьому зразок пухлини тестується на наявність генетичних змін одного з декількох генів, вибраних із B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16. Другий інгібітор вибирають відповідно до Таблиці 1. Переважно, другий інгібітор вибирають таким чином, щоб подолати резистентність до лікування інгібітором B-Raf.

Даний винахід також стосується генного чіпу, який використовують для виявлення генетичних змін в одному з декількох генів, вибраних із B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16, або який включає всі або декілька із вищезазначених генів. Генний чіп використовується для визначення механізму резистентності до лікування інгібітором B-Raf та для вибору другого інгібітору, який буде використаний в комбінованій медикаментозній терапії, яка подолас цю резистентність.

Конкретний варіант реалізації цього винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

(a) введення терапевтично ефективної кількості інгібітору B-Raf пацієнтові до моменту, поки не проявляється прогресування захворювання,

(b) отримання зразка пухлини у пацієнта після прогресування захворювання та тестування на наявність генетичної зміни в одному або більше генах, вибраних із групи, що складається з BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA і P16, та

(c) застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, при цьому другий інгібітор вибраний на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини, при цьому:

(i) другий інгібітор являє собою інгібітор Мек 1/2, в тому випадку, якщо є генетична зміна в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR, або

(ii) другий інгібітор являє собою інгібітор CDK 4, в тому випадку, якщо є генетична зміна в CCND1, CDK4 або P16, або

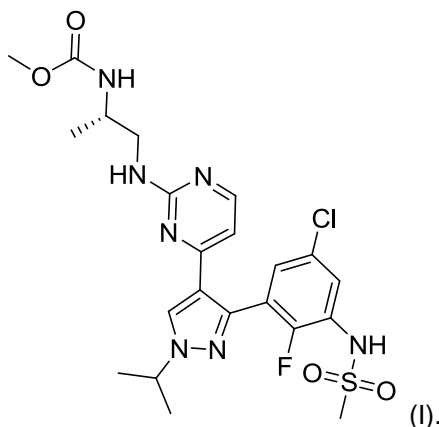
(iii) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази PI3, в тому випадку, якщо є генетична зміна в HER2, IGF-1R, PTEN або PIK3CA, або



(iv) другий інгібітор являє собою інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met, в тому випадку, якщо є генетична зміна в cMET, або

(v) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази FGFR в тому випадку, якщо є генетична зміна в FGFR1, FGFR2 або FGFR3.

5 Переважний інгібітор B-Raf, який використовується в даному винаході, являє собою Сполуку формули (I)

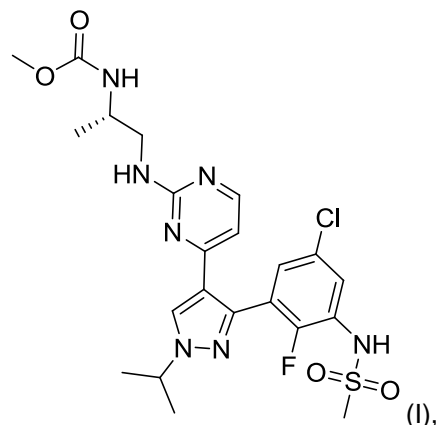


Сполука формули (I) та її застосування як інгібітору B-Raf розкриті у WO 2011/025927.

Таким чином, даний винахід, зокрема, стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 у B-Raf, який включає:

15 (а) отримання зразка пухлини від пацієнта та тестування на наявність генетичної зміни в одному або більше генів, вибраних із групи, що складається з BRAF, CRAF, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16, і

(b) застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор V-Raf формули (I)



20 або його фармацевтично прийнятну сіль та другий інгібітор, при цьому другий інгібітор вибирають на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини відповідно до Таблиці 1, зокрема, при цьому:

(i) другий інгібітор являє собою інгібітор Мек 1/2, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR або коли ніяких генетичних змін не було виявлено на етапі (b), або

(ii) другий інгібітор являє собою інгібітор CDK 4, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в CCND1, CDK4 або P16, або

(iii) другий інгібітор являє собою інгібітор кінзи PI3, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в HER2, IGF-1R, PTEN або PIK3CA, або

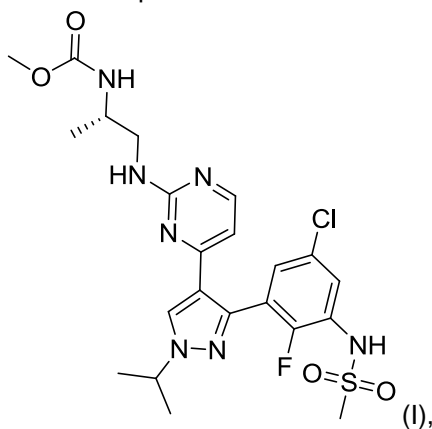
(iv) другий інгібітор являє собою інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в cMET, або

(v) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази FGFR, в тому випадку, якщо зразок пухлини має генетичну зміну в FGFR1, FGFR2 або FGFR3.

35 Більш конкретний варіант реалізації цього винаходу включає проведення монотерапії із використанням інгібітору B-Raf Формули (I) до початку комбінованої медикаментозної терапії.

Таким чином, даний винахід додатково стосується способу лікування пацієнта, який страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, зокрема, V600 мутацією в B-Raf, більш конкретно, меланою, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає:

- 5 (a) введення пацієнту терапевтично ефективної кількості інгібітору B-Raf формули (I)



або його фармацевтично прийнятної солі, поки у пацієнта не проявляється прогресування захворювання,

- 10 (b) отримання зразка пухлини у пацієнта після прогресування захворювання та тестування на наявність генетичної зміни в одному або більше генах, вибраних із групи, що складається з B-Raf, C-Raf, CCND1, CDK4, HER2, IGF-1R, cMET, FGFR1, FGFR2, FGFR3 EGFR, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS HRAS, PTEN, PIK3CA та P16,

- 15 (c) застосування комбінованої медикаментозної терапії, що включає інгібітор B-Raf та другий інгібітор, при цьому другий інгібітор вибирають на підставі генетичних змін, виявлених у зразку пухлини відповідно до Таблиці 1, зокрема, при цьому:

- (i) другий інгібітор являє собою інгібітор Мек 1/2, в тому випадку, якщо механізм прогресування захворювання характеризується генетичною зміною в BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR, або коли ніяких генетичних змін не було виявлено на етапі (b), або

- 20 (ii) другий інгібітор являє собою інгібітор CDK 4, в тому випадку, якщо механізм прогресування захворювання характеризується генетичною зміною в CCND1, CDK4 або P16, або

- 25 (iii) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази PI3, в тому випадку, якщо механізм прогресування захворювання характеризується генетичною зміною в HER2, IGF-1R, PTEN або PIK3CA, або

- (iv) другий інгібітор являє собою інгібітор рецепторної тирозинкінази c-Met в тому випадку, якщо механізм прогресування захворювання характеризується генетичною зміною в cMET, або

- 30 (v) другий інгібітор являє собою інгібітор кінази FGFR, в тому випадку, якщо механізм прогресування захворювання характеризується генетичною зміною в FGFR1, FGFR2 або FGFR3.

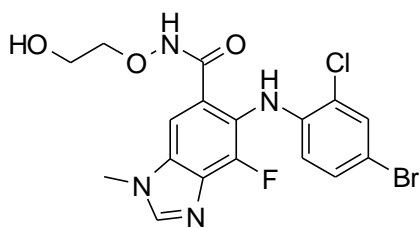
Сполука формули (I) може вводитися безперервно або переривчастою схемою дозування на етапах (a) та (c). Переважним є безперервне введення.

- У кожному із зазначених вище способів переважні варіанти реалізації винаходу особливо включають такі, в яких проліферативне захворювання характеризується мутацією V600 в B-Raf, наприклад, мутацією V600E. Проліферативні захворювання, які часто характеризуються такою мутацією, включають меланому, колоректальний рак, рак щитовидної залози, зокрема, папілярний рак щитовидної залози, астроцитому, рак підшлункової залози та нейрофіброматоз. Переважно, проліферативне захворювання являє собою меланому або колоректальний рак, який характеризується мутацією V600 в B-Raf, наприклад, V600E, V600G або V600K мутацією. Даний винахід особливо стосується такого способу, в якому проліферативне захворювання являє собою меланому, що характеризується мутацією V600 в B-Raf, наприклад, V600E, V600K або V600G мутацією.

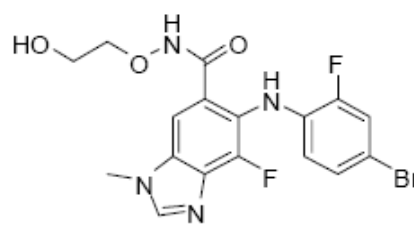
- Відповідні інгібітори Мек 1/2 для використання в складі даного способу відомі в даній галузі техніки. Інгібітори Мек 1/2, що використовуються в даному винаході, включають PD325901, PD-181461, ARRY142886/AZD6244, ARRY-509, XL518, JTP-74057, AS-701255, AS-701173, AZD8330, ARRY162, ARRY300, RDEA436, E6201, RO4987655/R-7167, GSK1120212 або AS703026.

У важливому варіанті реалізації винаходу інгібітори Мек 1/2 включають сполуки, описані у

WO03/077914, який включено в даний документ у повному об'ємі за допомогою посилання, зокрема, сполуку формули (II) або (III),



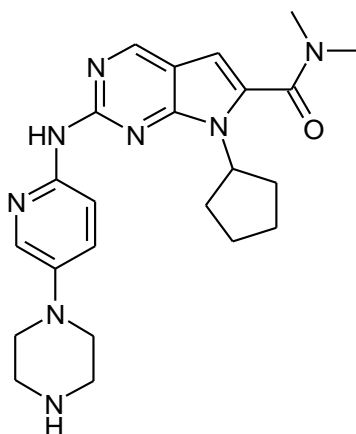
(II)



(III)

або їхні фармацевтично прийнятні солі (далі називаються Сполуками А і В, відповідно) та сполуки, описані у WO05/051906, WO05/023251, WO03/077855, US20050049419 та US7235537, які включено до даного документу в повному об'ємі за допомогою посилання, що охоплюють N3-алкіловані бензімідазоли та інші подібні гетероциклічні похідні, такі як інгібітори Мек 1/2, для лікування проліферативних захворювань.

Інгібітори CDK 4 відомі в даній галузі техніки та включають флавопірідол, P1446A-05, LEE011, AT7519, BMS265246, LY2835219 та PD-0332991. У конкретному варіанті реалізації винаходу інгібітор CDK 4 являє собою сполуку, описану в WO2007/140222 або WO 20210/020675, які включено в даний документ у повному об'ємі за допомогою посилання. У конкретному варіанті реалізації винаходу інгібітор CDK 4 являє собою сполуку формули (IV)



(IV),

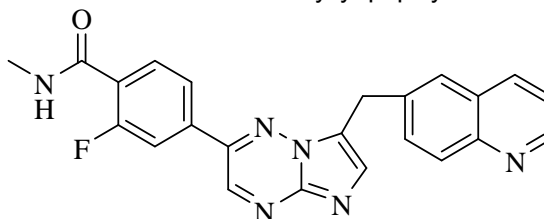
або її фармацевтично прийнятну сіль, яка далі називається як сполука С.

Інгібітори PI3 кінрази відомі в даній галузі техніки та включають перифозин, CAL-101, PX-866, BEZ235, SF1126, INK1117, GDC-0941, BKM120, XL147, XL765, Palomid529, GSK1059615, Zstk474, PTW33597, IC87114, TG100-115, CAL283, PI-103, BYL719, GNE-477, CUDC-907 та AEZS-136.

WO2006/122806, який включено в даний документ у повному об'ємі за допомогою посилання, описує похідні імідазохіноліну, які мають інгібувальну активність відносно PI3-кінрази. Дуже переважним за даним винаходом є сполука 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хінолін-3-іл-2,3-дигідро-імідазо[4,5-с]хінолін-1-іл)-феніл]-пропіонітрил та її монотосілатна сіль (СПОЛУКА D). Синтез 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хінолін-3-іл-2,3-дигідро-імідазо[4,5-с]хінолін-1-іл)-феніл]-пропіонітрилу, наприклад, є описаним у WO2006/122806, як приклади 7 та 152-3. Ще однією дуже бажаною сполукою за даним винаходом є 8-(6-метокси-піридин-3-іл)-3-метил-1-(4-піперазин-1-іл-3-трифторметил-феніл)-1,3-дигідро-імідазо[4,5-с]хінолін-2-он (СПОЛУКА E). Синтез 8-(6-метокси-піридин-3-іл)-3-метил-1-(4-піперазин-1-іл-3-трифторметил-феніл)-1,3-дигідро-імідазо[4,5-с]хінолін-2-ону, наприклад, є описаним у WO2006/122806, як приклад 86. WO07/084786 описує похідні піримідину, що мають інгібувальну активність відносно PI3-кінрази. Дуже переважною сполукою за даним винаходом є 5-(2,6-диморфолін-4-іл-піримідин-4-іл)-4-трифторметилпіридин-2-іламін (СПОЛУКА F). Синтез 5-(2,6-диморфолін-4-іл-піримідин-4-іл)-4-трифторметилпіридин-2-іламіну описано в WO07/084786 як приклад 10. Іншою переважною сполукою, що має інгібувальну активність відносно PI3-кінрази, є (S)-піролідин-1,2-дикарбонової кислоти 2-амід 1-((4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилетил)-піридин-4-іл]-тіазол-2-іл)-амід) (Сполука X).

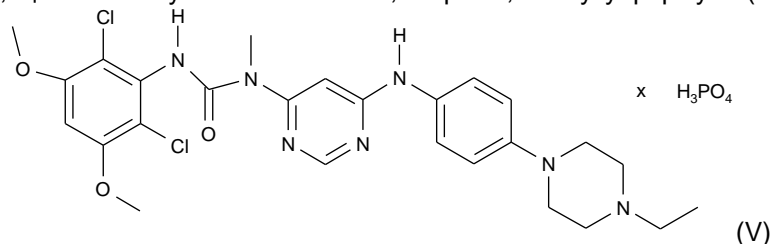
Інгібітори рецепторної тирозинкінази c-Met відомі в даній галузі техніки та включають кризотиніб, PHA-665752, SU11274, PF-04217903, форетиніб, SGX523, JNJ-38877605, GSK1363089, AMG208 та INCB28060. У конкретному варіанті реалізації винаходу інгібітор

рецепторної тирозинкінази c-Met являє собою сполуку формули IV



або її фармацевтично прийнятну сіль (далі Сполука G).

- Інгібітори кінази FGFR, що використовуються згідно з даним способом, являють собою переважно селективний та АТФ конкурентний пан інгібітор кінази FGFR, включаючи AZD4547 та BGJ398. У конкретному варіанті реалізації інгібітор кінази FGFR являє собою арил-піримідил-похідне сечовини, що описано у WO2006/000420, зокрема, сполуку формули (V)



або її фармацевтично прийнятну сіль (далі Сполука H).

- Особлива перевага надається варіантам реалізації винайдених способів, в яких інгібітором MEK 1/2 є Сполука А або Сполука В, особливо Сполука В, інгібітором CDK 4 є Сполука С, інгібітором PI3-кінази є Сполука D, Сполука Е, Сполука F або Сполука Х, особливо Сполука F, інгібітором рецепторної тирозинкінази c-Met є Сполука G і в яких інгібітором кінази FGFR є Сполука H або фармацевтично прийнятна сіль вищезазначених сполук.

- Інгібітор B-Raf формули (I) вводять в дозі від 150 до 600 в день, переважно від 400 до 600 в день, зокрема, 450 або 600 мг/день. Як другий інгібітор комбінованої медикаментозної терапії Сполуку В вводять у дозі від 15 до 60 мг два рази на добу, переважно, 45 мг два рази на добу, Сполуку С вводять у дозі від 100 до 900 мг/день, переважно, від 200 до 900 мг/день, наприклад, 200, 400, 700 або 900 мг/день, Сполуку F вводять у дозі від 30 до 100 мг/день, переважно, від 60 до 100 мг/день або від 60 до 80 мг/день, Сполуку G вводять у дозі від 50 до 300 мг два рази на добу, переважно, від 100 до 300 мг два рази на добу, наприклад, 100, 150, 200, 250 або 300 мг двічі на добу або Сполуку H вводять у дозі від 25 до 125 мг/день, наприклад, 75, 100 або 125 мг/день.

- Істотним варіантом реалізації вищезазначених способів є генетична зміна в BRAF, виявлена у зразку пухлини, яка являє собою відмінну від V600 мутацію.

- Даний винахід також стосується терапевтичних комбінацій, що включають інгібітор B-Raf, переважно інгібітор B-Raf Формули (I), та другий інгібітор, вибраний із групи, що складається з інгібітору PI3-кінази, інгібітору рецепторної тирозинкінази c-Met та інгібітору кінази FGFR для роздільного, одночасного або послідовного введення. Більш конкретно, терапевтична комбінація включає інгібітор B-Raf Формули (I) та другий інгібітор, який являє собою інгібітор кінази PI3, вибраний із групи, що складається із Сполуки D, Сполуки Е, Сполуки F та Сполуки Х або фармацевтично прийнятної солі цих сполук; або терапевтичної комбінації, що включає інгібітор B-Raf Формули (I) та другий інгібітор, який являє собою інгібітор c-Met, вибраний із Сполуки G або її фармацевтично прийнятної солі; або терапевтичної комбінації, що включає інгібітор B-Raf Формули (I) та другий інгібітор, який являє собою інгібітор кінази FGFR, вибраний із Сполуки H або її фармацевтично прийнятної солі, для роздільного, одночасного або послідовного введення. Далі такі терапевтичні комбінації наведені як КОМБІНАЦІЯ ЗА ВІНАХОДОМ.

- Додатково даний винахід стосується способу лікування пацієнта, що страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, наприклад, від меланоми, яка характеризується V600 мутацією в B-Raf, який включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості комбінації, що включає інгібітор B-Raf, переважно, інгібітор B-Raf Формули (I), та другий інгібітор, вибраний із групи, що складається з інгібітору кінази PI3, інгібітору рецепторної тирозинкінази c-Met та інгібітору кінази FGFR. Більш конкретно, даний винахід стосується способу лікування пацієнта, що страждає від проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, такою як мутація V600, наприклад, від меланоми, яка характеризується наявністю мутації V600 в B-Raf, який включає введення

пацієнту терапевтично ефективної кількості КОМБІНАЦІЇ ЗА ВІНАХОДОМ. Переважно, ці інгібітори вводяться в терапевтично ефективних дозах, які при змішуванні забезпечують позитивний ефект. Введення може бути роздільним, одночасним або послідовним.

Також даний винахід стосується КОМБІНАЦІЇ ЗА ВІНАХОДОМ для використання при отриманні фармацевтичної композиції або лікарського засобу для лікування або профілактики проліферативного захворювання, що характеризується мутацією в B-Raf, особливо V600 мутацією в B-Raf, наприклад, меланоми, яка характеризується V600 мутацією в B-Raf, у пацієнта, який потребує цього.

Даний винахід додатково передбачає комерційне фасування, що включає як терапевтичні засоби КОМБІНАЦІЮ ЗА ВІНАХОДОМ разом з інструкціями для одночасного, роздільного або послідовного їхнього введення для використання в уповільненні прогресування або лікуванні проліферативного захворювання.

Введення комбінації ЗА ВІНАХОДОМ може призвести не тільки до позитивного ефекту, наприклад, синергетичному терапевтичному ефекту, наприклад, відносно полегшення, уповільнення прогресування або пригнічення симптомів, але і до подальших дивовижних позитивних ефектів, наприклад, зменшення побічних ефектів, більш довготривалої відповіді, поліпшення якості життя або зменшення захворюваності, порівняно з монотерапією, що використовує тільки один із фармацевтично терапевтичних засобів, що використовуються в комбінації за винаходом.

Нижченаведені приклади призначені для ілюстрації, а не обмеження винаходу.

#### Приклад 1

Протягом першої частини дослідження пацієнтів лікують за допомогою інгібітору B-Raf Формули (I) як монотерапії у Рекомендованій Фазою II Дозі 450 мг/день. Інгібітор B-Raf Формули (I) вводять перорально у вигляді інкапсульованої твердої дисперсії.

У другій частині дослідження пацієнтів лікуватимуть інгібітором B-Raf Формули (I) в комбінації з другим засобом спрямованої дії (тобто інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука В, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука F, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука H, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука G або інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука C). Збільшення дози в складі кожної з комбінацій буде контролюватися згідно з моделлю Байєсівської логістичної регресії (БМЛР) з метою встановлення співвідношення Максимальної переносимої дози/Рекомендованої для проведення II Фази терапевтичної дози (МПД/Р2ФД) для кожної із комбінацій, якщо це не було раніше визначено в ході окремого випробування комбінації. Дизайн розширених випробувань із використанням немаскованої дози проводять з використанням БМЛР, що являє собою офіційно запроваджений метод для оцінки МПД та/або Р2ФД у хворих на рак. Адаптивна БМЛР буде орієнтована на принцип контролю передозування при збільшенні дози (КПЗД) для контролю ризику дозозлімітуючої токсичності (ДЛТ) у майбутніх пацієнтів при дослідженні. Збільшення індивідуальної дози для пацієнта буде дозволено після першого циклу для тих пацієнтів, які не зазнали ДЛТ.

Збільшення індивідуальної дози для пацієнта буде контролюватися за допомогою БМЛР з модифікованим КПЗД критерієм, який відображає індивідуальну переносимість у пацієнта. Використання Байєсівських адаптивних моделей відповіді на лікування для малих наборів даних було прийнято Європейським агентством лікарських засобів (ЄАЛЗ), та їхній розвиток і відповідне використання являє собою один з аспектів Ініціативи критичного шляху управління по санітарному нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США.

Обґрунтування необхідності вибору комбінованих препаратів

Дані доклінічних та клінічних досліджень показують, що одночасне, подвійне, вертикально спрямоване інгібування RAF/MEK/ERK сигнального шляху за допомогою комбінації інгібітору B-Raf Формули (I) та Сполуки В може вести до збільшення клінічної ефективності та, можливо, подолання ранньої резистентності до одиночного засобу у пацієнтів з BRAF V600-залежною прогресуючою меланою. Окрім того, інші механізми, які реактивують MAPK сигналінг або активують альтернативні шляхи, такі як PI3K/AKT сигнальний шлях, можуть відігравати роль у первинній та/або набутій резистентності до інгібіторів BRAF. Таким чином, протипухлинна активність інгібітору B-Raf Формули (I) в комбінації з вибраним засобом Сполуки F, Сполуки H, Сполуки G та Сполуки C, які спрямовані на кінази PI3K, c-met, FGFR та CDK4/6, відповідно, буде також оцінюватися на додаток до інгібітору B-Raf Формули (I) + Сполука В. Вибір комбінації інгібітору B-Raf Формули (I), що дається індивідуально пацієнтові, буде ґрунтуватися на генетичній(их) зміні(ах), виявленій(их) у зразку пухлини цього пацієнта при прогресуванні захворювання при лікуванні інгібітором B-Raf Формули (I) (див. Таблицю 1).

Опис суті дизайну дослідження

Це багатоцентрове, немасковане дослідження фази II, в якому візьмуть участь близько 100

пацієнтів із мутантною по BRAF локально прогресуючою або метастатичною меланою та яке складається з двох частин.

У першій частині, Частині I, пацієнти, "наївні" відносно селективного інгібітору BRAF, будуть проходити лікування з інгібітором B-Raf Формули (I), як одиночним засобом при P2ФД 450 мг/день, поки захворювання не прогресує (як визначено в RECIST ч. 1.1). Під час прогресування захворювання пухлину буде біопсовано та проаналізовано по вибраній панелі генів (Таблиця 1).

Пацієнти, які рецидивують в Частині I дослідження, будуть продовжувати отримувати інгібітор B-Raf Формули (I) як поодинокий засіб протягом терміну виконання молекулярного аналізу біопсії із резистентної пухлини доти, поки відповідна раціональна комбінація інгібітору B-Raf Формули (I) буде визначена та застосована.

На підставі генетичних змін виявлених у біопсії пухлини при рецидиві, групи пацієнтів увійдуть в другу частину дослідження, Частину II, для проведення спеціалізованого комбінованого лікування інгібітором B-Raf Формули (I) плюс другий засіб спрямованої дії. Там буде 5 напрямків, які відповідають 5 варіантам досліджуваного комбінованого лікування: інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука B, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука F, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука H, інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука G та інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука C. Вибір другого засобу буде визначений за наступною таблицею критеріїв - Таблиця 1. Очікується, що більш ніж половина включених у дослідження пацієнтів отримає комбіноване лікування інгібітором B-Raf Формули (I) плюс Сполука B після успіхів у лікуванні інгібітором B-Raf Формули (I).

Не "наївні" пацієнти відносно лікування інгібітором BRAF, у яких відзначався рецидив в попередньому дослідженні, в якому пацієнти з меланою, мутантною по BRAF V600, проходили лікування інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом, після настання прогресування захворювання можуть піддаватися лікуванню інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом в Частині II. Для цих пацієнтів результати аналізу свіжої біопсії пухлини, зібраної при відвідуванні в Кінці Лікування за попереднім випробуванням, будуть використовуватися для комбінованого лікування в Частині II.

Пацієнти з рецидивом, які беруть участь в інших дослідженнях інгібітору B-Raf Формули (I) як поодинокого засобу (наприклад, IIT), не проходитимуть лікування з інгібітором B-Raf Формули (I) після прогресування захворювання і перестануть приймати інгібітор B-Raf Формули (I) як поодинокий засіб доти, поки вони не будуть допущені до доцільної комбінованої терапії в Частині II дослідження.

Прогресуюче захворювання у цих пацієнтів вважається підтвердженням виходячи із попередніх досліджень та буде використане як базова лінія для оцінки пухлини для Частини II дослідження, якщо часовий інтервал перед клінічним випробуванням (KB) на момент прогресування захворювання і початком експериментального лікування в межах цього дослідження не перевищує 28 днів.

Всі пацієнти почнуть отримувати доцільну комбінацію, виходячи із певної подвійної комбінації МПД/Р2ФД або якщо подвійна комбінація МПД/Р2ФД раніше не була визначена, у вигляді Р2ФД 450 мг/день для інгібітору B-Raf Формули (I) (або у вигляді найвищої дози, яку переносить пацієнт) у комбінації з другим засобом у початковій дозволеній дозі по моделі Байєсівської логістичної регресії. Доцільна частина комбінованого лікування триватиме із можливістю зростання дози другого засобу до моменту, поки МПД/Р2ФД для комбінації не буде встановлена. Збільшення індивідуальної дози другого засобу для пацієнта, контрольоване БМЛР, буде дозволено у наперед визначених умовах для тих пацієнтів, у яких розвинулася толерантність до комбінації в призначеній дозі протягом щонайменше одного циклу.

Комбіноване лікування буде проводитися доти, поки захворювання прогресує у вигляді 21-денних циклів, показники пухлини під час комбінованого лікування будуть порівнюватися з перерахованою базовою лінією (тобто результат оцінки пухлини призводить до оцінки прогресування захворювання (ПЗ) при лікуванні інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом або в частині I або в попередньому дослідженні).

Попередній молекулярний скринінг

Для початку скринінгової фази дослідження пацієнти повинні мати письмову документацію мутації BRAF V600, яка повинна бути отримана на місці на свіжій біопсії пухлини (переважно) або на самому останньому архівному матеріалі зразка пухлини. Однак пацієнти, для яких молекулярний статус невідомий на момент розгляду для зарахування в дане дослідження, та ті, хто має пухлину, яка не піддавалася стандартній процедурі скринінгу на наявність мутації BRAF в місцевій лабораторії та для кого потрібно взяття свіжого зразка пухлини, підписуватимуть Інформовану згоду для попереднього молекулярного скринінгу, що дозволяє проведення забору свіжого зразка пухлини для оцінки мутаційного статусу на місці проведення

випробувань. Як тільки мутаційний статус гена BRAF V600 стає відомим або визначеним, пацієнт має право підписати основну частину Форми інформованої згоди дослідження та почати скринінг.

#### Скринінг

5 Як тільки мутаційний статус гена BRAF V600 стає відомим або визначеним, пацієнт має право підписати основну частину Форми інформованої згоди дослідження та почати скринінг. Всі скринінгові вимірювання повинні бути виконані до призначення експериментального лікування.

#### Період лікування

10 Передбачаються дві частини проведення лікування: Частина I та Частина II:

Частина I = це фаза проведення лікування поодиноким засобом та розпочнеться в День 1 Циклу 1 до початку проведення комбінованого лікування.

Частина II = це комбіноване лікування, повинне бути розпочато відразу, як тільки генетичні зміни з біопсії пухлини, взятої при рецидиві, стануть відомі.

15 Процедури експериментального лікування, з метою вивчення, будуть проводитися протягом 21-денних циклів та триватимуть до моменту прогресування захворювання (при проведенні комбінованого лікування, що складається з двох частин), токсичності, яку не можна перенести, відкликання інформованої згоди або смерті.

#### Популяція пацієнтів

20 Дослідження буде проводитися на дорослих пацієнтах з локально прогресуючою або метастатичною меланомою, яка несе підтверджену мутацію BRAF V600.

Пацієнти, зараховані в першу частину випробування (Частина I), повинні бути "наївними" відносно селективного інгібітору BRAF.

25 Пацієнти, які раніше піддавалися лікуванню інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом, можуть бути безпосередньо включені в Частина II, якщо біопсію пухлини було взято під час рецидиву.

Пацієнти, зараховані в це дослідження, не допускаються до участі в паралельних дослідженнях з вивчення препаратів або пристроїв. Окрім того, пацієнти, що завершили дослідження, не повинні бути повторно включені до другого курсу лікування.

30 Дослідник або призначена ним особа, повинен переконатися, що тільки тим пацієнтам, які задовольняють всім нижченаведеним вимогам та не мають критеріїв виключення, пропонується лікування в дослідженні.

#### Критерії включення

35 Пацієнти, які раніше не приймали інгібітор B-Raf Формули (I) (можуть бути включені в Частина I).

Пацієнти, які мають право на включення до дослідження, повинні відповідати всім наступним критеріям:

Вік  $\geq 18$  років на момент початку дозування препарату

40 Можливість зрозуміти та добровільно підписати форму інформованої згоди та здатність дотримуватися графіку відвідування дослідження та інших вимог протоколу. Підписана інформована згода має бути отримана до проведення процедур скринінгу.

Гістологічно підтверджений діагноз неоперабельної III стадії або метастатичної меланоми (стадія від IIIC до IV згідно з Американським об'єднаним комітетом з раку [АОКР]).

Письмова документація про BRAF V600 мутацію

45 Свіжа біопсія пухлини на рівні базової лінії та згода пацієнта на обов'язкове взяття біопсії при рецидиві, якщо немає медичних протипоказань.

Свідоцтво визначуваного захворювання, як встановлено RECIST ч. 1.1.

50 Примітка: вогнища ушкодження в зоні проведення попередньої променевої терапії або локорегіонарної терапії (наприклад, черезшкірна абляція) не слід розглядати як визначувані, до моменту, поки прогресування ураження не було задокументовано після початку терапії.

Середня тривалість життя  $\geq 3$  місяців

Загальносоматичний Статус згідно зі шкалою Всесвітньої організації охорони здоров'я (BOO3)  $\leq 2$ .

55 Негативний сироватковий тест на вагітність протягом 72 годин до першої дози експериментального лікування у всіх жінок дітородного віку.

Обов'язкова свіжа біопсія при рецидиві після лікування інгібітором B-Raf Формули (I) як поодинокій речовини повинна бути доступною.

60 Пацієнти, що беруть участь в інших дослідженнях інгібітору B-Raf Формули (I) як поодинокого засобу із задокументованим прогресуючим захворюванням, можуть приєднатися до Частини II за результатами профілю резистентності, які визначатимуть призначення

комбінованої терапії для лікування.

Прогресуюче захворювання цих пацієнтів повинне бути підтверджено, виходячи із попередніх досліджень за допомогою показників оцінки пухлини. Якщо інтервал часу між оцінкою пухлини при документуванні прогресування захворювання та першою дозою комбінованого лікування становить більш ніж 4 тижні (28 днів), повинна бути проведена нова оцінка пухлини. Біопсія, виконана наприкінці відвідування курсу Лікування попереднього дослідження та охарактеризована за допомогою всеосяжного геномного аналізу, буде необхідною для призначення комбінованого лікування.

Критерії виключення

Пацієнти, які мають право на участь у цьому дослідженні, не повинні відповідати якому-небудь із наступних критеріїв:

Участь у Частині I (лікування інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким речовиною):

Попереднє лікування з використанням RAF-інгібітору

Симптоматичне або неліковане лептоменінгеальне захворювання

Симптоматичні метастази в головний мозок. Пацієнти, які раніше проходили лікування або неліковані, виходячи із наявності цих станів, які є безсимптомними при відсутності терапії кортикостероїдами, мають право брати участь. Метастази в головний мозок повинні знаходитися в стабільному стані щонайменше три місяці із перевіркою за допомогою візуалізації (наприклад, МРТ головного мозку або КТ, які завершені до скринінгу та такі, які демонструють відсутність поточних доказів прогресуючих метастазів в головний мозок). Пацієнти не допускаються до отримання протиепілептичних препаратів, які індукують ферментативну активність.

Відомий гострий або хронічний панкреатит

Клінічно значуще серцеве захворювання, у тому числі будь-яке з нижченаведених:

Хронічна серцева недостатність (ХСН), що вимагає лікування (за шкалою класифікації, запропонованою Нью-Йоркською асоціацією серця, клас  $\geq 2$ ), фракція викиду лівого шлуночка (ФВЛШ)  $< 45\%$ , визначена за допомогою Радіонуклідної рівноважної вентрикулографії (РРВ) або ехокардіограми, або неконтрольована артеріальна гіпертензія (див. рекомендації з лікування гіпертензії ВООЗ-МІГ)

Історія хвороби або наявність клінічно значущих аритмій шлуночка або фібриляції передсердь

Клінічно значуща брадикардія в стані спокою

Нестабільна стенокардія протягом  $\leq 3$  місяців до початку дослідження препарату

Гострий інфаркт міокарда (ГІМ) протягом  $\leq 3$  місяців до початку дослідження препарату

Величина інтервалу QTcF (корекція Fridericia)  $> 480$  мсек при проведенні ЕКГ

Пацієнти з будь-яким з нижченаведених лабораторних показників на базовій лінії:

Абсолютна кількість нейтрофілів (АКН)  $< 1500/\text{мм}^3$  [ $1,5 \times 10^9/\text{л}$ ]

Тромбоцити  $< 100000/\text{мм}^3$  [ $100 \times 10^9/\text{л}$ ]

Гемоглобін  $< 9,0$  г/дл

Сироватковий креатинін  $> 1,5 \times \text{ВГН}$

Сироватковий білірубін  $> 1,5 \times \text{ВГН}$

АсАТ/SGOT та АлАТ/SGPT  $> 2,5 \times$  верхньої межі норми (ВМН) або  $> 5 \times$  ВМН, якщо присутні метастази в печінці.

Порушення функції шлунково-кишкового (GI) тракту або захворювання GI, які можуть істотно змінити всмоктування перорального інтервенційного препарату (наприклад, виразкові захворювання, неконтрольована нудота, блювання, діарея, синдром мальабсорбції, резекція тонкої кишки).

Попереднє або супутнє злоякісне захворювання. Винятки: адекватне лікування базального раку шкіри або плоскоклітинного раку шкіри; in situ карцинома шийки матки, радикально лікована та без доказів рецидиву протягом принаймні 3 років до моменту включення в дослідження; або інша, радикально лікована, солідна пухлина та без доказів рецидиву протягом щонайменше 3 років до моменту включення в дослідження.

Історія тромбоемболічних або цереброваскулярних подій протягом останніх 6 місяців, в тому числі транзиторна ішемічна атака, інсульт, тромбоз глибоких вен або легенева емболія.

Пацієнти, які отримували променеви терапію (що включає  $> 30\%$  резерву кісткового мозку), хіміотерапію, біологічну терапію (наприклад, антитіла) протягом  $\leq 4$  тижнів (6 тижнів для нітрозосечовини, мітоміцину-С) або які проходили постійне чи періодичне лікування з використанням низькомолекулярних терапевтичних чи досліджуваних засобів протягом 5 періодів напівжиття засобу (або  $\leq 4$  тижнів, коли період напівжиття невідомий) до початку дослідження препарату або які не оговталися від побічних ефектів такого лікування (за



винятком алопеції).

Пацієнти, які пройшли будь-яку серйозну операцію протягом останніх 2 тижнів до початку дослідження препарату або які не повністю оговталися від попередньої операції.

Відоме інфікування вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ).

5 Інший важкий, гострий або хронічний медичний або психічний стан або лабораторні аномалії, які можуть збільшити ризик, пов'язаний з участю у дослідженні, або введення досліджуваного препарату або те, що може перешкодити інтерпретації результатів дослідження та, на думку дослідника, зробить хворого таким, який не підходить для дослідження.

10 Вагітні або годуючі (ті, що виділяють молоко) жінки, коли вагітність визначається як стан жінки після зачаття і до закінчення вагітності, підтверджена позитивним лабораторним тестом на ХГЛ (>5 мМО/мл). Жінки дітородного потенціалу, що визначаються як всі жінки, фізіологічно здатні завагітніти, не допускаються до участі в цьому дослідженні, ЯКЩО вони не використовують високоефективні способи контрацепції протягом усього дослідження та протягом 10 днів після припинення прийому досліджуваного препарату.

15 Жінки після менопаузи можуть взяти участь у цьому дослідженні. Жінки вважаються такими, які перебувають в постменопаузі та не дітородного потенціалу, якщо вони мали 12 місяців природної (спонтанної) аменореї з відповідним клінічним профілем (наприклад, відповідають віку, історією вазомоторних симптомів) або шість місяців спонтанної аменореї з рівнем сироваткового фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) >40 мМО/мл або мали хірургічну  
20 білатеральну овариєктомію (з гістеректомією або без неї) або перев'язку маткових труб щонайменше за шість тижнів до скринінгу. У випадку видалення тільки яєчників, тільки тоді, коли репродуктивний статус жінки був підтверджений подальшою оцінкою рівня гормону, вона вважається не дітородного потенціалу.

25 Сексуально активні чоловіки повинні використовувати презерватив під час статевого акту при прийомі препарату та протягом 3 місяців після припинення лікування та не повинні зачатися дітей в цей період. Презерватив повинен бути використаний також чоловіком після вазектомії з метою запобігання доставки ліків через сім'яну рідину.

Експериментальне лікування

30 Досліджувані препарати, які будуть використані в цьому дослідженні, являють собою інгібітор B-Raf Формули (I), Сполуку В, Сполуку F, Сполуку H, Сполуку G та Сполуку C.

Процедури експериментального лікування являють собою:

Частина I: поодинокий засіб інгібітор B-Raf формули (I)

Частина II: подвійні комбінації

35 інгібітор B-Raf Формули (I) (QD) та Сполука В (BID)

інгібітор B-Raf Формули (I) (QD) та Сполука F (QD)

інгібітор B-Raf Формули (I) (QD) та Сполука H (QD)

інгібітор B-Raf Формули (I) (QD) та Сполука G (BID)

інгібітор B-Raf Формули (I) (QD) та Сполука C (QD)

Режими дозування

40

Таблиця 2

Доза та графік лікування

Процедури експериментального лікування	Лікарська форма та спосіб введення	Початкова Доза (21-денні цикли)
інгібітор B-Raf Формули (I)	Капсули для перорального застосування	450 мг/день або найвища допустима доза
Сполука В	Капсули для перорального застосування	45 мг BID
Сполука F	Капсули для перорального застосування	60 мг
Сполука H	Капсули для перорального застосування	75 мг
Сполука G	Капсули для перорального застосування	150 мг BID
Сполука C	Капсули для перорального застосування	200 мг

Інструкції з введення в інгібітор B-Raf Формули (I) + другий засіб

Інгібітор B-Raf Формули (I), Сполуку F, Сполуку H та Сполуку C вводять перорально за щоденним графіком (QD) в рівно фіксованій дозі та незалежно від ваги тіла або площі поверхні тіла.

QD Дозування: Пацієнти повинні бути проінструктовані, щоб приймати капсули з інгібітором B-Raf Формули (I) (та Сполуку F, Сполуку H або Сполуку C) щодня, запиваючи великою склянкою води (~250 мл) вранці. При прийомі всіх доз препарату пацієнти повинні голодувати протягом 2 годин до та після прийому досліджуваного препарату. Якщо пацієнт забуває прийняти дозу вранці, то він/вона повинен прийняти дозу протягом 6 годин після пропущеної дози. Якщо більш ніж 6 годин пройшло, то від дози потрібно відмовитися в цей день та пацієнт повинен продовжувати лікування з наступної запланованої дози. Якщо з якої-небудь причини сніданок не споживається, то пацієнт повинен як і раніше приймати заплановану ранкову дозу зі склянкою води. Якщо це відбувається у дні повного взяття зразків для ФК, це має бути задокументовано.

Сполуку B та Сполуку G приймають перорально за графіком два рази в день (BID) в рівно фіксованій дозі та незалежно від ваги тіла або площі поверхні тіла.

BID Дозування: Дози Сполуки B або Сполуки G повинні прийматися окремо одна від одної в інтервалі 12±2 години. Пацієнти будуть проінструктовані для того, щоб приймати дози щодня, запиваючи великою склянкою води (~250 мл) вранці та ввечері. Для комбінації інгібітору B-Raf Формули (I) та Сполуки G під час прийому всіх доз пацієнти повинні голодувати протягом 2 годин до та після прийому досліджуваного препарату. Для комбінації інгібітору B-Raf Формули (I) та Сполуки B під час прийому всіх ранкових доз, пацієнти не повинні нічого їсти протягом 2 годин перед прийомом досліджуваного препарату та утримуватися від прийому їжі протягом 2 годин після прийому інгібітору B-Raf Формули (I) та Сполуки B. Під час прийому всіх вечірніх доз пацієнти повинні голодувати 1 годину до та після прийому Сполуки B. Відзначимо, що обидва препарати (інгібітор B-Raf Формули (I) + Сполука B або Сполука G) повинні бути прийняті разом вранці та тільки ліки, які приймаються BID (Сполука B або Сполука G) повинні бути прийняті у вечірній час.

Інструкції для прийому препарату у дні, коли виконується забір зразків для ФК:

Зразки для ФК перед дозою повинні бути взяті безпосередньо перед прийомом дози.

При кожному відвідуванні відповідальний персонал за місцем проведення випробування буде стежити за тим, щоб відповідні дози кожного досліджуваного препарату були прийняті пацієнтом, та надавати пацієнту правильну кількість досліджуваного(них) препарату(ів) для подальшого дозування. Пацієнти будуть проінструктовані відносно повернення за місцем проведення випробування невикористаних досліджуваних препаратів при кожному відвідуванні.

Пацієнти повинні бути проінструктовані відносно того, щоб ковтати капсули/таблетки цілими та не жувати або давити їх.

Будь-які дози, які пропущені, не повинні бути замінені або об'єднані під час наступного запланованого дозування або на наступний день, залежно від того, коли доза застосовується.

Пацієнти повинні уникати вживання грейпфрута, граната, карамболі, Севільського апельсина або продуктів, що містять їхній сік, протягом усього дослідження та, переважно, за 7 днів до першої дози досліджуваного препарату у зв'язку з потенційною взаємодією CYP3A4 з досліджуваними лікарськими препаратами. Вживання апельсинового соку допускається.

Якщо виникає блювання та/або діарея під час курсу лікування, не допускається повторне дозування для пацієнта до моменту наступної запланованої дози. Появу та частоту або блювання та/або діареї (або підвищеної частоти випорожнення) протягом 4 годин після прийому препарату слід відзначити в розділі побічні ефекти (ПЕ) Електронної індивідуальної реєстраційної карти (eIPK). Крім того, в дні забору зразків для повної ФК, час початку будь-яких епізодів блювання протягом перших 4 годин після прийому дози в цей день повинен бути відзначений відповідно до Листа призначень eIPK.

Дослідник або відповідальний персонал за місцем проведення випробування повинен проінструктувати пацієнта прийняти досліджувані препарати згідно з протоколом (сприяти дотриманню). Всі приписання та розподілення доз для пацієнта, всі зміни дози, всі пропущені прийоми доз під час дослідження повинні бути записані в Листі призначень eIPK. Звітність по препарату повинна бути виконана на регулярній основі. Пацієнти будуть проінструктовані відносно повернення невикористаних досліджуваних препаратів за місцем проведення випробування в кінці кожного циклу. Персонал за місцем проведення випробування буде стежити за тим, щоб відповідні дози кожного досліджуваного препарату були прийняті пацієнтом при кожному відвідуванні та надавати пацієнту правильну кількість препаратів для подальшого дозування.

Для комбінованого напрямку з використанням інгібітору B-Raf Формули (I) в комбінації тільки

зі Сполукою F

Інструкції для призначення в дні, коли виконується натщесерце моніторинг глюкози в плазмі крові: у дні моніторингу глюкози в плазмі крові натщесерце пацієнти повинні голодувати протягом ночі щонайменше 8 годин до забору крові. Легкий сніданок/закуси можуть вживатися після вимірювання глюкози в плазмі крові натщесерце. Інгібітор B-Raf Формули (I) (та Сполука F, якщо вона застосовується) може бути прийнятий через 2 години після сніданку. Пацієнти повинні продовжувати голодування протягом 2 годин після прийому інгібітору B-Raf Формули (I) (та Сполуки F, якщо вона застосовується).

Тривалість лікування

Пацієнти можуть продовжувати лікування з інгібітором B-Raf Формули (I) як монотерапії до моменту піддавання непереносимій токсичності та/або припинення лікування на розсуд дослідника або відкликання інформованої згоди. При прогресуванні захворювання, після лікування інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом, пацієнтам призначатиметься комбінована терапія відповідно із генетичними змінами, визначеними в біопсії при рецидиві. Пацієнти не можуть продовжувати комбіноване лікування поки вони відчувають непереносиму токсичність, прогресування захворювання та/або якщо лікування припинено на розсуд дослідника чи відкликана інформована згода.

Керівництво відносно підвищення дози

Обґрунтування для призначення початкової дози.

Інгібітор B-Raf Формули (I) як поодинокий засіб

Доза для інгібітору B-Raf Формули (I) для пацієнтів, які увійшли в першу частину цього випробування, встановлюється на рівні 450 мг QD, що відповідає P2ФД поодинокого засобу. Вибір початкової дози відповідає рекомендаціям керівництва відносно Доклінічної оцінки протипухлинних лікарських препаратів ICH S9 для вибору початкової дози для першого дослідження на людині, проведеного на пацієнтах із раком, та представлений у Таблиці 6-2.

Інгібітор B-Raf Формули (I) в комбінації зі Сполукою B:

Початкова доза для інгібітору B-Raf Формули (I) плюс Сполука B встановлюється для інгібітору B-Raf Формули (I) 600 мг QD та Сполуки B 45 мг BID або найвища доза для комбінації з доведеною безпекою.

Інгібітор B-Raf Формули (I) в комбінації з другим засобом (Сполука F, Сполука H, Сполука G або Сполука C):

У другій частині цього випробування початкові дози для інгібітору B-Raf Формули (I) та другого засобу будуть, відповідно, 450 мг QD (P2ФД) або найвища доза, що переноситься для інгібітору B-Raf Формули (I) та найвища доза для другого засобу, що допускається БМЛР (див. Таблиця 3).

P2ФД для інгібітору B-Raf Формули (I) була заявлена як 450 мг QD.

Якісна оцінка взаємодії "препарат-препарат" (ВПП) прогнозує відсутність істотного впливу на дію інгібітору B-Raf Формули (I) або Сполуки F, коли вони приймаються разом. Кількісний аналіз з використанням симулятора SimCYP підтвердив цю оцінку. Отже, початкова доза для цієї комбінованої пари вибирається так, щоб відповідати встановленій в даний момент P2ФД для інгібітору B-Raf Формули (I) та 75 % МПД для Сполуки F: 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 75 мг Сполуки F.

Кількісна оцінка ВПП з використанням симулятора Simсур передбачає мінімальні зміни в дії інгібітору B-Raf Формули (I) при спільному прийомі зі Сполукою H. При дозі інгібітору B-Raf Формули (I) 450 мг очікується, що дія (максимальна концентрація (C<sub>max</sub>) та площа під кривою (AUC) Сполуки H знижується на 20-40 %. Отже, початкова доза для цієї комбінованої пари вибирається так, щоб відповідати встановленій в даний момент P2ФД для інгібітору B-Raf Формули (I) та 60 % МПД для Сполуки H: 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 75 мг Сполуки H.

Кількісна оцінка ВПП із використанням симулятора Simсур передбачає збільшення на 76 % та 43 % AUC та C<sub>max</sub> інгібітору B-Raf Формули (I), відповідно, також як і зниження на 54 % та 36 % AUC та C<sub>max</sub> Сполуки G, відповідно, коли 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 150 мг BID Сполуки G приймаються разом. У клініці інгібітор B-Raf Формули (I) був протестований в дозі до 700 мг QD та спостережувані побічні ефекти є оборотними та контрольованими, отже, потенційна ВПП між двома молекулами, яка може призвести до потенційно підвищеної концентрації інгібітору B-Raf Формули (I), ніж та, яка була встановлена на даний час P2ФД, не являє собою ризику, так як побічні ефекти є спостережуваними, контрольованими та оборотними. Початкова доза для цієї комбінованої пари вибирається так, щоб відповідати встановленій в даний момент P2ФД для інгібітору B-Raf Формули (I) та 50 % МПД для Сполуки G: 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 150 мг Сполуки G.

Кількісна оцінка ВПП з використанням симулятора Simсур передбачає збільшення на 43 % та 20 % AUC та C<sub>max</sub> інгібітору B-Raf Формули (I), відповідно, також як і зниження на 43 % та 37 % AUC та C<sub>max</sub> Сполуки С, відповідно, коли 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 300 мг Сполуки С приймаються разом. У клініці інгібітор B-Raf Формули (I) був протестований в дозі до 700 мг QD та спостережувані побічні ефекти є оборотними та контрольованими, отже, потенційна ВПП між двома молекулами, яка може привести до потенційно підвищеної концентрації інгібітору B-Raf Формули (I), ніж та, яка була встановлена на даний час Р2ФД, не являє собою ризику, так як побічні ефекти є спостережуваними, контрольованими та оборотними. Початкова доза для цієї комбінованої пари вибирається так, щоб відповідати встановленій на даний момент Р2ФД для інгібітору B-Raf Формули (I) та ~23 % дози протестованої на даний момент на рівні дозування в 900 мг QD, оскільки максимально переносимої дози (МПД) для Сполуки С не було досягнуто: 450 мг QD інгібітору B-Raf Формули (I) та 200 мг Сполуки С.

У цьому дослідженні фармакокінетичні показники для всіх партнерів по комбінації, а також їх активних метаболітів (якщо це можливо) будуть оцінюватися якнайскоріше в стаціонарному стані та в порівнянні із даними, отриманими у відповідних дослідженнях монотерапії для оцінки потенційної взаємодії препарат-препарат.

До того, як буде призначена доза для першого пацієнта із застосуванням однієї із комбінацій, Байєсівська модель для цієї комбінації буде оновлена за допомогою самих останніх даних із поточного випробування поодиноким засобу для підтвердження, що початкові дози, які пропонуються для інгібітору B-Raf Формули (I) та другого засобу все ще є допустимими (тобто відповідають критерію КПЗД). Якщо запропонована початкова доза не відповідає критеріям, буде використана більш низька доза для комбінації, яка відповідає критерію КПЗД.

Рівні попереднього дозування

Таблиця 3 описує початкові дози та рівні попереднього дозування у процедурах експериментального лікування для комбінацій, які можуть оцінюватися в ході цього випробування. Додаткові рівні дозування, невизначені в даний час, можуть бути включені в дослідження та додаткові пацієнти можуть бути включені в дослідження із застосуванням вже випробуваних доз, якщо такі зміни будуть вважатися необхідними для отримання оптимальних даних відносно безпеки та переносимості, фармакокінетики та фармакодинаміки.

Таблиця 3

Рівні попереднього дозування

Рівень дозування* (мг)	Інгібітор B-Raf QD	Спол. В	Спол. F	Спол. H	Спол. G	Спол. С
		BID	QD	QD	BID	QD
-2**	150	15	30	25	50	100
-1**	300	30	40	50	100	150
1 (початкова доза)	450 (600 для напрямку з використанням Сполуки В)	45 (Р2ФД)	60	75	150	200
2	450	-	80	100	200	400
3	450	-	100 (МПД)	125 (МПД)	250	700
4	450	-	-	-	300	900

\*Можливими є додаткові та/або проміжні рівні дозування для додавання в ході дослідження Груп, які можуть бути додані на будь-якому рівні дозування нижче рівня МПД з метою кращого розуміння безпеки, ФК або ФД.

\*\* Рівень дозування -1-2 також буде використаний для пацієнтів, що вимагають зниження дози, порівняно з рівнем початкової дози. Зниження дози нижче рівня дозування -2 не допускається для даного дослідження.

Варіант реалізації рішення про підвищення дози

Рішення відносно підвищення дози для другого засобу матиме місце після оцінки індивідуальної переносимості пацієнтом подвійної комбінації протягом першого 21 дня циклу.

Для реалізації варіанта рішення про підвищення дози, наявна інформація по токсичності (включаючи несприятливі події та лабораторні аномалії, які не стосуються ДЛТ), рекомендації по БМЛР та доступна інформація по ФК та ФД, все це буде оцінюватися в ході ухвалення

рішення про дозування. Застосування препарату у більш високому дозуванні не здійснюється доти, поки дослідник не отримає письмове підтвердження, що результати по попередньому рівню дозування були оцінені та, що вони є допустимими для переходу до більш високого дозування. Якщо приймається рішення збільшувати дозування до більш високої дози, але один або більше додатковий(ві) пацієнт(и) на попередньому рівні дози відчуває ДЛТ протягом першого циклу лікування, то БМЛР буде оновлена з використанням цієї нової інформації перш, ніж які-небудь додаткові пацієнти перейдуть до більш високого дозування.

Процес збільшення дозування буде здійснюватися поетапно та триватиме в групі з 3 пацієнтів. Тільки другий засіб, Сполука F, Сполука H, Сполука G або Сполука C буде збільшено в дозуванні відповідно до БМЛР.

Не допускається збільшення індивідуальної дози для пацієнта в будь-який час в рамках частини I лікування інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом.

Збільшення індивідуальної дози другого засобу дозволяється у другій частині комбінованої терапії, за винятком пацієнтів, що беруть участь в напрямку лікування інгібітором B-Raf Формули (I) + Сполука B, які будуть піддаватися лікуванню за заявленою Р2ФД комбінації інгібітору B-Raf Формули (I) та Сполука B (45 мг BID).

З метою лікування пацієнта більш високою дозою Сполуки F, Сполуки H, Сполуки G або Сполуки C, він або вона повинен мати переносимість нижньої дози комбінації щонайменше протягом 1 циклу терапії (наприклад, він або вона не повинні відчувати початкову токсичність при більш низькій парі доз за шкалою Загальних критеріїв термінології для небажаних явищ (ЗКТНЯ) рівня  $\geq 2$ , для яких приналежність до дослідження препаратів не може бути змінена). Окрім того, нова більш висока доза для пари сполук із застосуванням якої пацієнт піддається лікуванню, повинна відповідати модифікованому критерію КПЗД, використовуваному для збільшення індивідуальної дози (додаткові посилання до розділу).

Пацієнти, нещодавно включені в наступну групу, будуть починати лікування в дозі, встановленій під час останньої наради по збільшенню дози. Байєсівська модель логістичної регресії (БМЛР) та межі індивідуальної дози для пацієнта надалі будуть оновлюватися для наступної групи.

Переривання лікування та припинення лікування

Якщо пацієнт потребує відстрочення отримання дози інгібітору B-Raf Формули (I), Сполуки B, Сполуки F, Сполуки H, Сполуки C або Сполуки G на  $>21$  послідовний день від передбачуваної дати наступної запланованої дози, то пацієнт повинен бути виключений з експериментального лікування. У виняткових ситуаціях, якщо експериментальне лікування приносить явну користь пацієнту (тобто відбувається стабілізація захворювання, часткова відповідь на лікування, повна відповідь на лікування) та, на думку дослідника, не присутні проблеми безпеки, пацієнт може залишатися на експериментальному лікуванні дозування, рівень якого встановлений на основі безпеки.

Попередній молекулярний скринінг

Інформована згода на проведення попереднього молекулярного скринінгу

Інформована згода на проведення попереднього молекулярного скринінгу має бути підписана до моменту проведення будь-якої, пов'язаної з дослідженням, процедури попереднього молекулярного скринінгу (не застосовується, якщо мутаційний статус BRAF вже був оцінений поза дослідженням). Це застосовується лише до пацієнтів Частини 1.

Мутаційний статус BRAF по свіжому або архівному матеріалу біопсії

Для початку скринінгової фази дослідження пацієнти повинні мати письмову документацію мутації BRAF V600, яка повинна бути отримана на місці на свіжій біопсії пухлини (переважно) або на самому останньому архівному матеріалі зразка пухлини. Інформована згода на проведення попереднього молекулярного скринінгу має бути підписана до моменту проведення будь-якої, пов'язаної з дослідженням, процедури попереднього молекулярного скринінгу (не застосовується, якщо мутаційний статус вже був оцінений поза дослідженням).

Після того, як мутація V600 кодону BRAF (наприклад, V600E/K/D/R) підтверджена уповноваженою місцевою лабораторією та задокументована на місці проведення випробування, пацієнт може почати процедуру скринінгу.

Період лікування

Період лікування розділений на дві частини:

Частина I. Пацієнти, "наївні" відносно інгібітору BRAF, прийматимуть дозу інгібітору B-Raf Формули (I) безперервно протягом 21-денного (3 календарні тижні) циклу, починаючи від Дня 1 Циклу 1. Між циклами не буде ніякої запланованої перерви. Пацієнти будуть отримувати інгібітор B-Raf Формули (I) як поодинокий засіб до початку комбінованого лікування після прогресування захворювання або появи непереносимої токсичності незалежно від того, що

відбудеться раніше.

Частина II. Пацієнти, які отримували інгібітор B-Raf формули (I) щонайменше протягом одного 21-денного циклу та захворювання яких прогресує, увійдуть до Частини II, щоб отримувати комбіноване лікування інгібітором B-Raf формули (I) + другий засіб, вибране на основі генетичних змін, визначених у біопсії пухлини при рецидиві.

Немає фіксованої тривалості лікування; пацієнти можуть продовжувати лікування з інгібітором B-Raf Формули (I) як поодиноким засобом до моменту початку комбінованого лікування та першого випадку прогресування захворювання, виникнення непереносимої токсичності, яка виключає подальше лікування та/або лікування припиняється на розсуд дослідника або відмови пацієнта (відкликання інформованої згоди). При першому випадку прогресування захворювання, коли відомі результати аналізу біопсії, пацієнти можуть ініціювати комбіноване лікування з інгібітором B-Raf Формули (I) + другий інгібітор до моменту другого випадку прогресування захворювання, виникнення непереносимої токсичності, яка виключає подальше лікування та/або лікування припиняється на розсуд дослідника або відмови пацієнта (відкликання інформованої згоди).

Якщо пацієнт залишається в дослідженні, незважаючи на необхідність переривання дози на >21 день, оскільки хворий відчув об'єктивні докази клінічної ефективності, на думку дослідника в інтересах пацієнта залишатися в дослідженні.

Байєсівська модель логістичної регресії

Адаптивна БМЛР, яка керується принципом КПЗД, контролюватиме збільшення дози кожного з досліджуваних ліків (Сполука F, Сполука H, Сполука G або Сполука C) у поєднанні з інгібітором B-Raf Формули (I) по їхніх відповідних МПД/Р2ФД. Для кожної комбінації БМЛР для комбінованого лікування буде розрахована з урахуванням 5 параметрів за даними дозообмежуючої токсичності Циклу 1 (тобто наявності чи відсутності ДЛТ), отриманих протягом збільшення дози для моделювання взаємозв'язку доза-токсичність для Сполуки F, Сполуки H, Сполуки G або Сполуки C в комбінації з інгібітором B-Raf Формули (I).

Опис моделей БЛР, попередні розподіли для параметрів моделі (на основі наявної в даний час інформації про засоби направленої дії) та супутні показники, що передують розподілу ДЛТ, представлені в Додатку 1.

Рекомендація дози

Рекомендація дози для партнера по комбінації обумовлена дозою інгібітору B-Raf Формули (I), яка може відрізнитися між пацієнтами, які входять до Частини II. Ця рекомендація буде ґрунтуватися на найостанніших заключних рівня ДЛТ, включаючи середнє, медіанне, стандартне відхилення, 95 %-довірчий інтервал та ймовірність того, що справжній рівень ДЛТ для кожної комбінації дози лежить в межах наступних категорій:

[0 %, 16 %] знижена доза

[16 %, 35 %] спрямована токсичність

[35 %, 100 %] надмірна токсичність

Дотримуючись принципу КПЗД, після кожної групи пацієнтів рекомендована доза для комбінації являє собою дозу із найбільшою подальшою ймовірністю ДЛТ в цільовому інтервалі [16 %, 35 %] серед доз, що задовольняють критерію передозування, який являє собою ймовірність надмірної токсичності, яка менше ніж 25 %. Окрім того, максимальне збільшення дози для комбінації всередині групи протягом дослідження двох препаратів обмежено до 100 %, при цьому 100 % означає суму відносного збільшення для кожного із досліджуваних препаратів, тобто 0 % та 100 % для інгібітору B-Raf Формули (I) (доза для якого не може перевищувати 450 мг) та для другого засобу спрямованої дії (доза для якого не може виходити за межі його МПД/Р2ФД, якщо такі вимірювання проводилися) відповідно.

Збільшення індивідуальної дози для пацієнта для партнера по комбінації буде обмежено до 50 % та керуватиметься БМЛР згідно з подальшим модифікованим критерієм КПЗД, який відображає індивідуальну переносимість пацієнта: пацієнт зможе збільшити індивідуальну дозу до дози, для якої існує менш ніж 40 % вірогідності надмірної токсичності. Окрім того, якщо пов'язані із лікуванням явища токсичності класу 2 за шкалою ЗКТНЯ спостерігаються у 2 або більше пацієнтів при рівні дозування або, якщо хто-небудь із пацієнтів відчуває токсичність класу 3 або вище, збільшення дози партнера по комбінації буде  $\leq 25$  % для будь-якого наступного збільшення дози.

Клінічне узагальнення наявної інформації про токсичність (у тому числі ПЕ, які не стосуються ДЛТ), ФК, ФД та інформації про ефективність, а також рекомендації байєсівської моделі, будуть використовуватися для визначення дози комбінації для наступної групи в ході наради відносно збільшення дози. Дослідники та клінічний персонал будуть брати участь у прийнятті рішень.

Модель для будь-якої комбінації буде переглянута перед зарахуванням будь-яких додаткових пацієнтів в групу, якщо перші 2 обстежених пацієнти в групі зазнали ДЛТ до зарахування 3-го пацієнта. Остаточна рекомендована МПД/Р2ФД для кожної комбінації буде ґрунтуватися на обговореннях рекомендації, отриманої із використанням БМЛР та на загальній оцінці безпеки, беручи до уваги дані толерантності із наступних циклів по всіх різних комбінаціях тестованих доз.

#### Приклад 2

##### Матеріали та способи

Маточні розчини сполук готували в ДМСО в кінцевій концентрації 10 мМ. Робочі розчини серійно розводили у відповідному середовищі для культивування клітин із кроком в 3 рази, щоб досягти кінцевої концентрації в діапазоні від 2,7 мкМ до 1,2 нМ.

Клітинні лінії, культура клітин, вимірювання життєздатності клітин

Клітини A-375 та WM-266-4 були придбані із Американської колекції типових культур (АКТК). Клітини A-375 культивували в середовищі DMEM (АКТК) та клітини WM-266-4 культивували в середовищі EMEM (АКТК), обидва середовища були доповнені 10 % фетальної бичачої сироватки (Gibco) та інкубувалися при 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Клітинні лінії, модифіковані генно-інженерним шляхом для експресії загальнопоширених алелей, що вказують на резистентність, були придбані у Novartis-Emeryville. Ці моделі резистентності включають клітини A-375, які експресують мутантну MEK1P124L, усічену p61-BRAFV600E або мутантний NRASQ61K та клітини WM-266-4, які експресують мутантну MEK1C121S, усічену p61-BRAFV600E або мутантний NRASQ61K. Ці клітини культивували у відповідному середовищі із додаванням селективного маркера G418 та за присутності 5 мкМ LFE158 (мутантна форма MEK) або L1H720 (усічена кіназа p61-BRAFV600E).

Схема планшета, розподіл клітин та додавання сполуки

Для скринінгу клітини висівали в 80 мкл середовища в 384-ямкові планшети (Thermo Scientific, кат. № 4332) при густині клітин 500 (A-375) або 750 (WM-266-4) клітин на ямку із використанням MultiDrop Combi (Thermo-Fisher) зі стандартною 8-канальною касетою. Для забезпечення рівномірного розподілу клітин по всій внутрішній частині ямки, клітини центрифугували при 1000 об/хв протягом короткого періоду часу та інкубували при кімнатній температурі 30 хвилин. Всі планшети інкубували при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин до моменту додавання сполуки. Маточний розчин сполуки був приготований безпосередньо перед дослідженням у відповідному культуральному середовищі та додавався за допомогою РАА робота, оснащеного контактним інструментом об'ємом в 200 нл. Мінімум у трьох повторюваних ямках ефект поодинокого засобу та комбінації був оцінений після 72 годин інкубації шляхом кількісної оцінки рівня клітинного АТФ за допомогою Cell Titer Glo (Promega) відповідно до протоколу виробника та мікроскопічною візуалізацією. Для візуалізації клітини фіксували в планшетах та пермеабілізували розчином 10 % ПФА, 0,3 % TX-100 в НФБ за допомогою дозатора WellMate з контрольованою швидкістю дозування. Ядра клітин забарвлювали за допомогою Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen) та всі необхідні етапи промивання проводилися із використанням вошера BioTek.

Автоматизований аналіз зображення

Зображення, отримані за допомогою InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare, 28-9534-63), були у форматі TIFF та мали розмір 2048 × 2048 пікселів, охоплюючи всю ямку 384-ямкового планшета. Автоматизований аналіз даних був зроблений за допомогою оригінальних скриптів у відкритому доступі, статистичної програмної мови R та функцій з пакету BioConductor з EBImage. Метою було визначення числа життєздатних ядер (клітин) на ямку як приблизного показника життєздатності клітин. Програмна послідовність складається із семи етапів: (I.) згладжування зображення, щоб зменшити кількість піків інтенсивності, (II.) застосування порогової функції для розділення переднього плану (сигналу) від фону (шуму), (III.) визначення локальних максимумів на передньому плані, що слугують для відсіву ядер, (IV.) фільтрації локальних максимумів, що знаходяться в безпосередній близькості, (V.) обчислення ядер із решти локальних максимумів, (VI.) та вилучення властивостей об'єкта від обчислених ядер (число ядер, їхній розмір та інтенсивність сигналу). Як останній етап (VII), щоб виключити уламки клітин (наприклад фрагментовані ядра) з підрахунку, об'єкти, визначені в ямках, оброблених ДМСО та Стауроспорином, були використані для отримання функцій розподілу для життєздатних та фрагментованих ядер відповідно. Вони були використані для визначення кордону для показників відмінностей між життєздатними та фрагментованими ядрами. Кількість фрагментованих ядер вираховували із загальної кількості ідентифікованих об'єктів та результат був задокументований як кінцева кількість для цієї ямки.

Нормалізація даних

Дані, що складаються із трьох вимірів для кожного варіанта (сполуки) обробки, 42 повтори оброблених ДМСО ямок та 2 повтори для оброблених Стауреспорином ямок. Дані були нормалізовані до медіани вимірювань ДМСО та узагальнені шляхом розрахунку медіани з трьох повторів. Дані було імпортовано в Chalice для розрахунку синергії для сполуки.

5

Таблиця 4

Діаграма значень  $IC_{50}$  для Поодинокі сполуки та Оцінка синергії для комбінації, як визначено із використанням СТГ-аналізу на основі АТФ

Батьківська клітинна лінія	Алелі резистентності	Спол. Формули (I) $IC_{50}$ (нМ)	Спол. В $IC_{50}$ (нМ)	Комбінація Надлишкова синергія Лево
A-375	-	4	51	3,0
A-375	MEK1 <sup>P124L</sup>	333	>2700	7,8
A-375	p61 BRAF <sup>V600E</sup>	576	961	4,6
A-375	NRAS <sup>Q61K</sup>	134	206	4,3
WM-266-4	-	2	50	4,2
WM-266-4	MEK1 <sup>C121S</sup>	35	821	5,4
WM-266-4	p61 BRAF <sup>V600E</sup>	906	>2700	5,8
WM-266-4	NRAS <sup>Q61K</sup>	1122	>2700	5,1

Таблиця 5

Діаграма Значень  $IC_{50}$  для Поодинокі сполуки та Оцінка синергії для комбінації, як визначено із використанням мікроскопічного аналізу

Батьківська клітинна лінія	Алелі резистентності	Спол. Формули (I) $IC_{50}$ (нМ)	Спол. В $IC_{50}$ (нМ)	Комбінація Надлишкова синергія Лево
A-375	-	4	57	2,4
A-375	MEK1 <sup>P124L</sup>	300	>2700	9,3
A-375	p61 BRAF <sup>V600E</sup>	849	969	5,9
A-375	NRAS <sup>Q61K</sup>	133	150	4,6
WM-266-4	-	3	77	4,7
WM-266-4	MEK1 <sup>C121S</sup>	58	1210	6,3
WM-266-4	p61 BRAF <sup>V600E</sup>	933	>2700	6,8
WM-266-4	NRAS <sup>Q61K</sup>	868	>2700	4,5

### Приклад 3

- Ефекти від поодинокого засобу та комбінації у вигляді інгібіторів RAF (Сполука Формули (I) та PI3Kα (Сполука X) кіназ на проліферацію семи мутантних по BRAF клітинних ліній CRC. Усі клітинні лінії експресують протеїн BRAFV600E. Клітини, які несуть відомі або ймовірні активаційні мутації в гені PI3Kα, позначені як (\*) та клітини із втратою PTEN позначені як (#). Проліферацію клітин вимірювали через 72 години за допомогою cell titer glo™ аналізу, та всі отримані результати являють собою результат щонайменше триразових вимірювань. Показано значення  $IC_{50}$  для Сполуки Формули (I) та Сполуки X як поодинокого засобу. Вимірювання ступеня синергії (SS), а також індекс для комбінації ( $CI_{50}$ ) при 50 % від ефекту наведені для кожної комбінації в Таблиці 6. Взаємодії вважалися як синергетичні, коли значення SS були  $\geq 2,0$  та значення  $CI \leq 0,5$ . Взаємодії вважалися як адитивні/синергетичні, коли значення SS були  $\geq 2,0$ , проте, значення  $CI > 0,5$  або SS значення були  $< 2,0$ , проте значення  $CI$  були  $\leq 0,5$ . Взаємодії позначалися як адитивні, коли значення SS були  $< 2,0$  та значення  $CI > 0,5$ . Позначення для синергії наведені у стовпці "Сутність ефекту".



Таблиця 6

Комбінації спол. Формули (I) із спол. X в клітинних лініях CRC мутантних по BRAF<sup>V600E</sup>

Назва клітинної лінії	Тип раку	Спол. X формули (I)		Комбінація		
		IC <sub>50</sub> [нМ]	IC <sub>50</sub> [нМ]	SS	CI <sub>50</sub>	Опис ефекту
SW1417	CRC	235	>2700	2,46±0,06	0,27±0,04	синергетичний
COLO 205	CRC	5,0	>2700	3,80±0,06	0,69±0,01	Адитивний/синергетичний
LS411N	CRC	18	>2700	2,76±0,07	0,49±0,03	синергетичний
CL-34	CRC	30	>2700	4,48±0,1	0,57±0,03	Адитивний/синергетичний
HT-29*	CRC	49	>2700	4,31±0,06	0,21±0,02	синергетичний
RKO*	CRC	1965	>2700	5,24±0,05	0,22±0,01	синергетичний
SNU-C5*	CRC	>2700	>2700	2,44±0,1	0,47±0,07	синергетичний
OUMS-23 <sup>#</sup>	CRC	>2700	>2700	0,64±0,06	N/C	синергетичний

## Приклад 4

Цей Приклад спрямований на дослідження впливу Сполуки Формули (I) та Сполуки F у вигляді поодиноких засобів та в комбінації на ріст моделей клітинних ліній HT-29 та RKO in vivo. Концентрація та схема дозування для інгібіторів становили 50 мг/кг q.d (Сполука Формули (I) та 32,7 мг/кг q.d (Сполука F). Всі сполуки вводили в складі комбінації в тих же дозах, в яких вони були у вигляді поодинокого засобу. Дозування було зупинено на 28-й день для моделі HT-29 та після 21 дня для моделі RKO. Результати проілюстровано на Фігурі 1 та 2, відповідно.

## Приклад 5

Усі клітинні лінії були отримані з АКТК (SK-MEL-5, SK-MEL-24, UACC-62, COLO 741, COLO-800, WM-266-4, Colo205, LS411N, SW 1417), ЕККК (MDST8), DSMZ (CL-34) та HIP (LOX IMVI). Клітини культивували в середовищі RPMI1640 (АКТК, Номер за каталогом 30-2001) або DMEM (АКТК, Номер за каталогом 30-2002) із додаванням 10 % (або 20 % для CL-34 клітин) ФБС (GIBCO, Номер за каталогом 10099-141) відповідно до рекомендацій виробників. Клітинні лінії культивували при 37 °C та 5 % CO<sub>2</sub> в інкубаторі та пересівали у флакони T-75. У всіх випадках клітини відтавали із заморожених запасів, культивували протягом ≥1 пасажу із використанням розведення 1:3, підраховували та оцінювали життєздатність за допомогою лічильника ViCell (Beckman-Coulter) перед тим, як сіяти у 96-ямкові або 6-ямкові планшети. Для того, щоб розділити та розсіяти клітинні лінії, клітини вилучали із флаконів з використанням суміші 0,25 % трипсин-ЕДТА (GIBCO, Номер за каталогом 25200). Усі клітинні лінії були перевірені на предмет відсутності контамінації мікоплазмою, як це було виявлено за допомогою методики для визначення з використанням ПЛР, виконаної на базі Idexx Radil (Колумбія, Міссурі, США) та правильність ідентифікації клітинних ліній було підтверджено за допомогою панелі поліморфізмів поодиноких нуклеотидів (ППН).

Сполуку Формули (I) та Сполуку H розчиняли в 100 % ДМСО (Cellgro, Номер за каталогом 25-290-CQC) в концентрації 10 мМ та зберігали при -20 °C до моменту використання. Сполуки були послідовно розведені із кроком в 3 рази сім разів в 96-ямкових планшетах з об'ємом ямки 2 мл (Greiner Bio-One, номер за каталогом 780271), забезпечуючи діапазон концентрації від 22 нМ до 16200 нМ. Рекombінантний основний FGF людини був придбаний у R&D system (Номер за каталогом 233-FB) та переведений у форму суспензії із концентрацією 50 мкг/мл в стерильному НФБ. Він був використаний у фіксованій концентрації 100 нг/мл у всіх експериментах.

Для аналізу CellTiter-Glo™ клітини переносили в оброблені 96-ямкові планшети для культур тканин (Costar, Номер за каталогом 3904) для отримання кінцевого об'єму 80 мкл середовища та при густині в 3000 клітин на ямку. Протягом від 12 до 24 годин після посіву 20 мкл кожної серії розведення сполуки було перенесено в планшет, що містить клітини, в результаті чого діапазон концентрацій сполуки становив від 2700 нМ до 3,7 нМ при 3-кратному розведенні, та кінцева концентрація ДМСО становила 0,16 %. Загальний об'єм в кожній ямці становив 120 мкл. Планшети інкубували протягом 72 год. та вплив сполук на проліферацію клітин визначали із використанням Люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo™ (CTG, Promega) та планшетного рідера Victor™ X4 (Perkin Elmer). Для аналізу росту клітин в реальному часі, клітини висівали в xCELLigence E-планшети (Roche, Номер за каталогом 05232368001) при густині 4000 клітин на ямку в загальному об'ємі середовища 90 мкл та, через 24 години після

посіву, 11 мкл середовища, зі Сполукою або без неї, було додано в ямки. 2-4 повтори ямок були засіяні для всіх клітинних ліній та оброблюваних груп, за винятком клітин COLO 741, оброблених LGX818+FGF2 (N=1). Там, де зазначені кінцеві концентрації Сполук та ростового фактора становили 1 мкМ для Сполуки Н, 100 нг/мл для FGF2 та 100 нМ (SK-MEL-5) або 500 нМ (COLO 741) для Сполуки Формули (I). Стан клітин постійно оцінювали кожні 2 години протягом семи днів із вимірюванням повного опору в режимі реального часу з використанням клітинного аналізатора xCELLigence. Повний опір вимірювали із використанням електродів на Е-планшетах зі збільшенням охоплення площі поверхні клітин, створюючи більший опір на електроді. Повний опір на електроді відображався у вигляді значень клітинного індексу та використовувався як умовна величина для оцінки життєздатності та кількості клітин. У всіх випадках значення клітинного індексу були нормовані до точки часу безпосередньо після додавання сполуки.

Для вестерн-аналізу клітини висівали в 6-ямкові планшети (Costar, Номер за каталогом 3506) при густині  $5 \times 10^5$  клітин на ямку в 2,0 мл повного культурального середовища. У період від дванадцяти до 24 годин після посіву клітини обробляли різними сполуками та у всіх експериментах Сполука Формули (I), Сполука Н та FGF2 були використані в кінцевих концентраціях 100 нМ, 1,0 мкМ та 100 нг/мл, відповідно. Клітини збирали із використанням свіжоприготованого буфера для лізису клітин (Cell Signaling Technology, Номер за каталогом 9803); доповнений інгібіторами фосфатази (PhosStop, Roche, Номер за каталогом 04906845001) та протеази (Roche, Номер за каталогом 11697498001) через 2 та 24 години після додавання сполуки. Протеїни з клітинних лізатів були розділені за допомогою електрофорезу в NuPAGE 4-12 % Bis-Tisgелі середніх розмірів (Novex, Номер за каталогом WG1402BX10), перенесені на нітроцелюлозні мембрани, які, в подальшому, інкубували з антитілами від Cell Signaling Technology (Danvers, Массачусетс, США), які розпізнають фосфориловану форму р-AKT (S473, Номер за каталогом 4058), загальна кількість AKT (Номер за каталогом 2920), фосфориловану форму ERK1/2 (T202/Y204, Номер за каталогом 9101), загальна кількість ERK1/2 (Номер за каталогом 9107), фосфориловану форму р-MEK1/2 (S217/221, Номер за каталогом 9121) та  $\beta$ -актин (Ambion, Номер за каталогом AM4302). Вестерн-блоти проявляли шляхом інкубації з IRDye 680RD антитілами кози, проти IgG кроля (Li-Cor, Номер за каталогом 926-68071) та IRDye 800 CW антитілами кози, проти IgG миші (Li-Cor, Номер за каталогом 926-32210), сканували з використанням інфрачервоної системи візуалізації Odyssey (Li-Cor, Лінкольн, Небраска, США).

Щоб визначити, чи може FGFR сприяти виживанню певних субпопуляцій клітинних ліній, мутантних по BRAFV600E, оброблених Сполукою Формули (I), антипроліферативні ефекти цієї сполуки були досліджені на одинадцяти клітинних лініях T1799, мутантних по BRAF, за присутності або відсутності активаційного ліганду FGFR-FGF2. За відсутності FGF2, величини  $IC_{50}$  в шести меланомах та п'яти клітинних лініях CRC знаходилися в діапазоні від 3,0 до 470 нМ та від 4,0 до 185 нМ, відповідно (Таблиця 7). Величини  $IC_{50}$ , виміряні для шести клітинних ліній, були незмінними у присутності FGF2, однак, для решти п'яти клітинних ліній відповідь на Сполуку Формули (I) була або значно зменшеною (наприклад, для CL-34) або повністю відсутньою (наприклад, для LS 411N). Таким чином, присутність FGF2 сприяє виживанню субпопуляції BRAFV600E клітинних ліній меланоми при анти-проліферативному впливі інгібітору B-Raf Формули (I). Крім того, аналогічні ефекти спостерігаються в клітинних лініях з мутацією BRAFV600E, отриманих з пухлин при CRC.

Таблиця 7

Назва клітинної лінії	Тип раку	BRAF	PTEN	LGX818 $IC_{50}$ [нМ]	LGX818+FGF2 $IC_{50}$ [нМ]
SK-MEL-5	шкіра	мут	дт	15	>1000
SK-MEL-24	шкіра	мут	мут	470	369
UACC-62	шкіра	мут	мут	2,0	4
COLO 741	шкіра	мут	дт	53	2652
COLO-800	шкіра	мут	дт	9	12
WM-266-4	шкіра	мут**	мут	3	4
CL-34	CRC	мут	дт	38	730,0
Colo 205	CRC	мут	дт	4	5
LS411N	CRC	мут	дт	185	9232
MDST8	CRC	мут	Невідомо	141	10000
SW1417	CRC	мут	дт	165	364

Значення  $IC_{50}$  для Сполуки Формули (I) як поодинокого засобу з або без додавання 100

нг/мл FGF2 для панелі клітин меланоми T1799 мутантних по BRAF та ліній клітин CRC. Статус мутантного (мут) та дикого типу (дт) був визначений з опублікованих даних. Всі BRAF мутації призводили до V600E заміни, за виключенням випадків з MDST8 (мут \*) та WM-266-4 (мут \*\*), які мали заміни V600K та V600D відповідно. Позначення PTEN мут являють собою узагальнене поняття, яке включає мутацію, число копій гена та інформацію про експресію мРНК для гена PTEN.

Щоб визначити, чи залежить виживання клітин меланоми з мутацією BRAFV600E під дією FGF2 від сигналіngu FGFR, ми досліджували здатність селективного інгібітору FGFR, Сполуки Н, запобігати FGF2-опосередкованому виживанню. Дві клітинні лінії, виживання яких стимулювали різними рівнями FGF2 (COLO 741 та SK-MEL-5, Таблиця 8-1), культивували в середовищі, що містить Сполуку Формули (I) та FGF2 за присутності або відсутності Сполуки Н та вимірювали ріст в реальному часі.

Відповідно до отриманих раніше даних IC<sub>50</sub>, Сполука Формули (I) пригнічує ріст обох клітинних ліній та це пригнічення росту нівелювалося додаванням FGF2 (Фігура 3). Як поодинокий засіб, Сполука Н не впливає на проліферацію будь-якої з клітинних ліній (діаграма А, не показано для SK-MEL-5), а поєднання зі Сполукою Формули (I), за відсутності FGF2, не сприяє його активності як поодинокого засобу. У поєднанні зі Сполукою Формули (I), у присутності FGF2, Сполука Н проявляє антипроліферативні ефекти на рівнях, спостережуваних при відсутності FGF2. Ці результати показують, що FGF2-опосередковане виживання може бути попереджене за допомогою додавання селективного інгібітору FGFR - Сполуки Н.

Щоб дослідити, чи може відновлена активність MAPK або активований сигналінг PIK3C лежати в основі FGF2-опосередкованого виживання, ефекти FGF2 на сигналінг MAPK та PIK3C були оцінені за допомогою вестерн-блот аналізу фосфорилованих MEK1/2 (MAP2K1/2), ERK1/2 (MAPK1/2) та AKT1/2/3. Як проілюстровано на Фігурі 4, інкубація клітин COLO 741 та SK-MEL-5 зі Сполукою Формули (I) призводила до помітного пригнічення сигналіngu MAPK на 2-гу та 24-ту годину після додавання сполуки, що оцінювалося по зниженню рівнів фосфорилованих MEK та ERK. Рівні фосфорилованих AKT не змінювалися протягом 2 годин, але незначне зниження проявлялося після 24 годин в COLO 741 клітинах. На противагу цьому, ані FGF2, ані Сполука Н, при додаванні у вигляді поодиноких засобів, не впливали на сигналінг після 2 або 24 годин. При об'єднанні FGF2 та Сполуки Формули (I) мінімальні зміни в сигналіngu, відносно тільки Сполуки Формули (I), спостерігалися через 2 години після обробки (хоча, невелике збільшення р-ERK спостерігалося в клітинах SK-MEL-5) проте, рівні фосфорилованих MEK та ERK були істотно, хоча і не повністю, відновлені через 24 години. Нарешті, додавання Сполуки Н до комбінації Сполука Формули (I)/FGF2 повністю запобігало FGF2-індукованим змінам у сигналіngu MAPK та PIK3C. Ці дані переконливо підтверджують пригнічення анти-проліферативних ефектів інгібітору B-Raf FGF2, призводячи до реактивації сигналіngu MAPK, та вказують на те, що Сполука Н здатна повністю пригнічувати ці FGF2-індуковані зміни в сигналіngu.

#### Приклад 6

Задача: оцінити ефективність комбінації Сполуки Формули (I) та інгібітору CDK 4, Сполука С, на моделі первинної меланоми HMEX1906, яка стійка до Сполуки Формули (I) при концентрації 5 мг/кг та вирощується за його присутності (HMEX1906-R5).

Склад препарату: Сполука С включає до свого складу 0,5 % МЦ/0,5 % Tween80 та Сполука Формули (I) включає до свого складу 20 % ПЕГ300/3 % ТПГС.

Пухлини нарізані/подрібнені до отримання суспензії подібної клітинної лінії (гомогенізованих пухлин). Було додано 7 мл матригелю та 1,5 мл забуференого розчину Хенкса (3РХ). Суспензію нагрівали в долоні доти, поки Матригель мав густу консистенцію та імплантували за допомогою голки 18G підшкірно в правий бік самкам голих мишей.

Миші були розподілені на наступні групи на 18-й день після імплантації із середнім об'ємом пухлини 266 мм<sup>3</sup> та середньою масою тіла 25 грамів.

Групи: 10 мишей/група, РО шляхом, об'єм дози 0,2 мл

Група 1: Розчинник, 0 мг/кг bidx14

Група 2: Сполука С, 250 мг/кг qdx21

Група 3: Сполука Формули (I), 5 мг/кг bidx21

Група 4: Сполука С 250мг/кг qd x21 + Сполука Формули (I) 5 мг/кг bid x21

Результати:

Група	Середня зміна об'єму пухлини в порівнянні з контролем (Е/К) (%)	Регресія (%)	Середня зміна об'єму пухлини (мм <sup>3</sup> ± СПС)	Середня зміна ваги тіла (% ± СПС)	Вживаність (Ті, що вижили/Загальна кількість)
1	100	-	2092±154	4,2±2,6	7/10*
2	4	-	86±26	5,3±1,4	10/10
3	39	-	807±106	3,5±1,1	10/10
4	-	64,32	-170±45	7,1±1,6	10/10

\* 3 миші були вбиті у зв'язку із наявністю великої пухлини

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

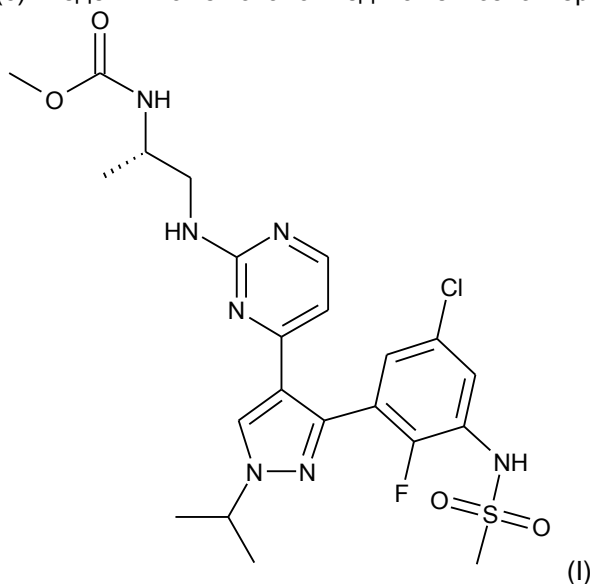
1. Спосіб лікування пацієнта, який страждає на меланому, що характеризується мутацією В-Raf, який включає:

(а) введення пацієнту терапевтично ефективної кількості інгібітора В-Raf або його фармацевтично прийнятної солі до моменту, поки не виявляється прогресування захворювання;

10

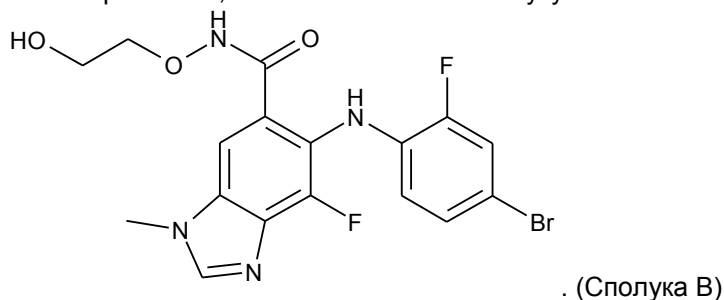
(b) отримання зразка пухлини у пацієнта після прогресування захворювання і тестування на наявність генетичної зміни в одному або більше генах, вибраних з групи, яка складається з BRAF, CRAF, MAP2K1, MAPK2, NRAS, KRAS HRAS або EGFR; і

(с) введення комбінованої медикаментозної терапії, що включає Сполуку Формули (I):



15

і інгібітор Мек 1/2, який являє собою Сполуку В:

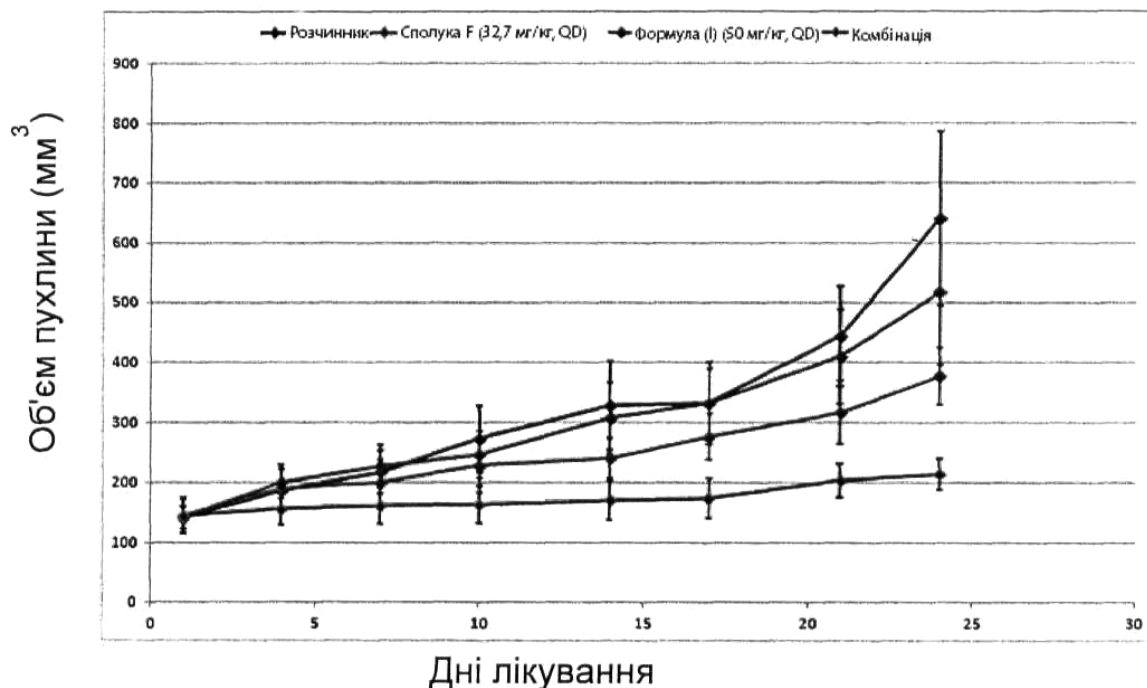


2. Спосіб за п. 1, в якому інгібітор В-Raf на стадії (а) являє собою Сполуку Формули (I).

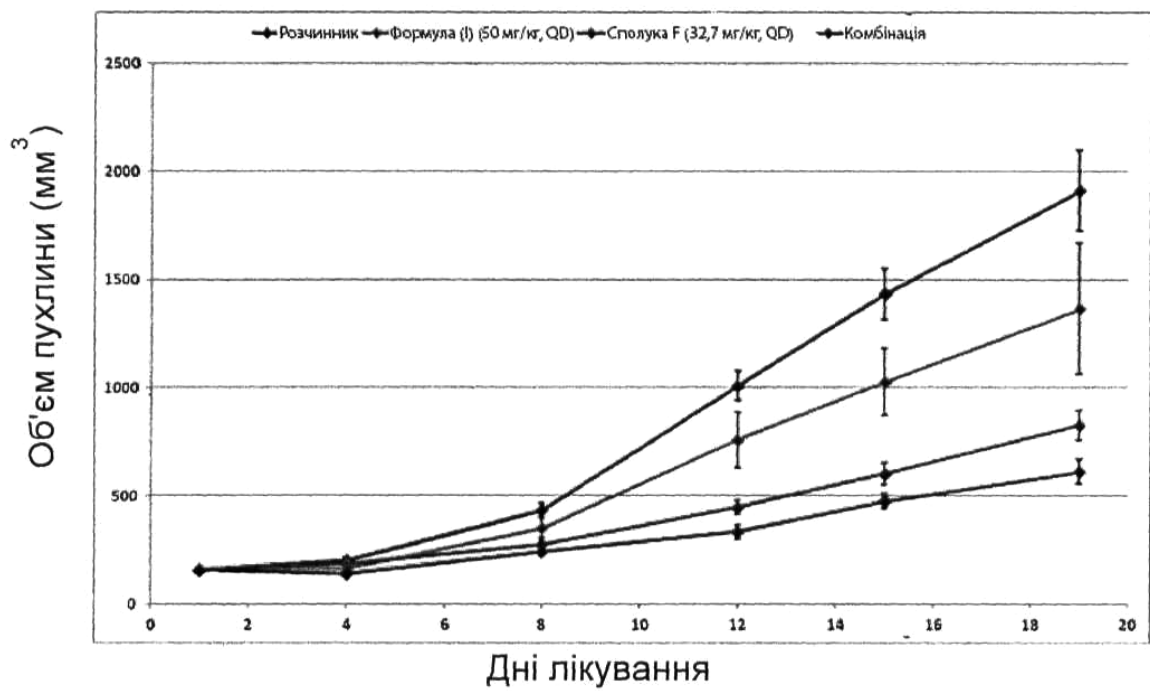
3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому ген являє собою BRAF.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, в якому генетичні зміни можуть бути результатом ампліфікації одного або декількох генів, мутацій в одному або декількох генах або втрати активності одного або декількох генів.
5. Спосіб за п. 4, в якому один або декілька генів являють собою BRAF.
- 5 6. Спосіб за п. 5, в якому мутація являє собою мутацію V600 в BRAF.
7. Спосіб за п. 6, в якому мутація V600 в BRAF являє собою мутацію V600E або мутацію V600K.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, в якому прогресування захворювання оцінюють за допомогою критеріїв RECIST.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому інгібітор B-Raf на стадії (а) вводять як монотерапію.
- 10 10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, в якому інгібітор B-Raf на стадії (а) вводять безперервно або в якому інгібітор B-Raf на стадії (а) вводять переривчасто.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, в якому Сполуку Формули (I) на стадії (с) вводять безперервно або в якому Сполуку Формули (I) на стадії (с) вводять переривчасто.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, в якому інгібітор B-Raf на стадії (а) вводять перорально.
- 15 13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, в якому Сполуку Формули (I) і Сполуку В на стадії (с) кожен вводять перорально.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, в якому інгібітор B-Raf на стадії (а) вводять в дозі від 150 мг до 600 мг на день.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-14, в якому Сполуку Формули (I) на стадії (с) вводять в дозі від 150 мг до 600 мг на день або в якому Сполуку Формули (I) на стадії (с) вводять в дозі 450 мг на день.
- 20 16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-15, в якому Сполуку В на стадії (с) вводять в дозі від 15 мг до 60 мг два рази на день або в якому Сполуку В на стадії (с) вводять в дозі 45 мг два рази на день.
17. Спосіб за п. 15 або 16, в якому дві дози Сполуки В вводять з інтервалом в 12 годин.
- 25 18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, в якому Сполуку Формули (I) і Сполуку В вводять в ході 21-денного циклу.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, в якому меланома є локально прогресуючою або метастатичною меланомою, і/або в якому меланома є неоперабельною меланомою III стадії або метастатичною меланомою III-IV стадії.
- 30 20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, в якому до стадії (а) пацієнт раніше не приймав інгібітор BRAF.

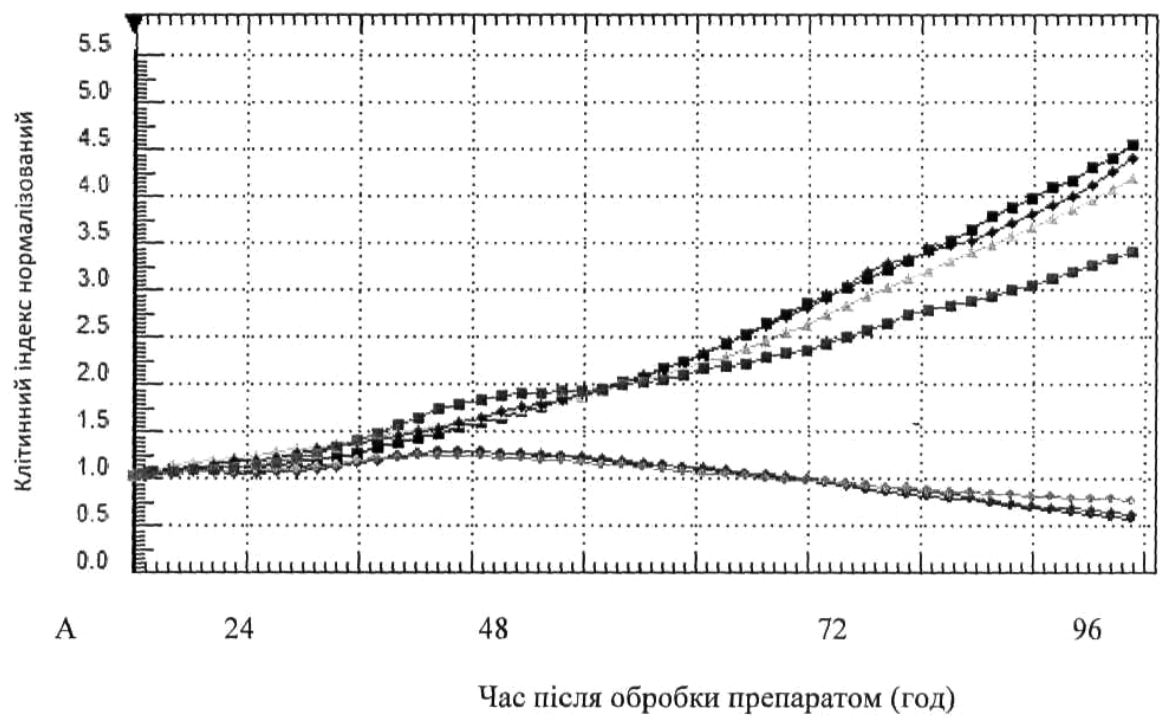
Фігура 1

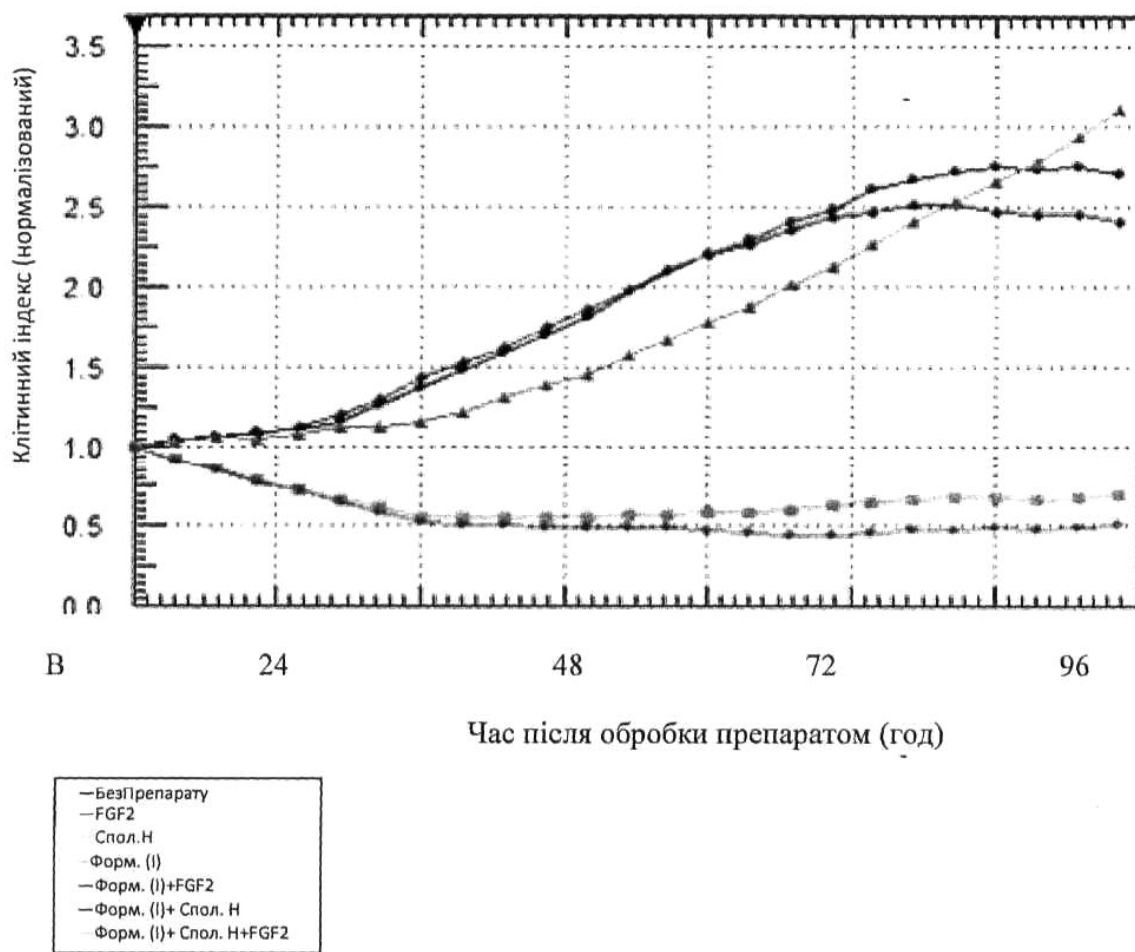


Фігура 2

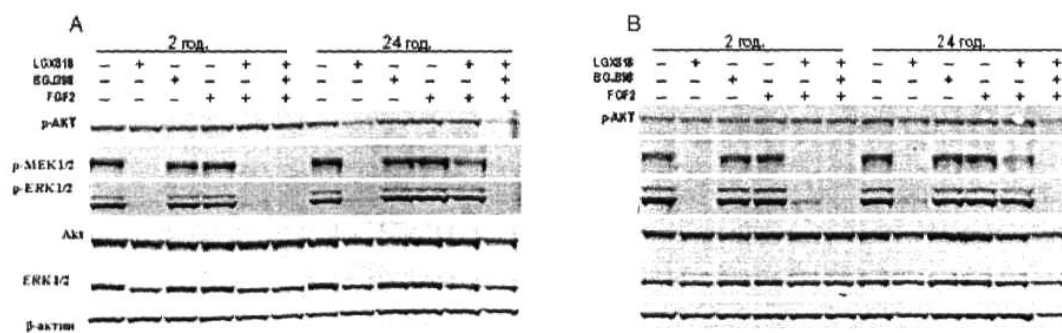


Фігура 3





Фігура 4



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601